

## ガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体組成物

技術分野

本発明は、ガングリオシド GM2 に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体組成物、該抗体組成物を生産する形質転換体、該抗体組成物の製造方法および該抗体組成物を含む医薬に関する。

背景技術

シアル酸を有する糖脂質の一種であるガングリオシドは、動物の細胞膜を構成しており、親水性側鎖である糖鎖と、疎水性側鎖であるスフィンゴシンおよび脂肪酸とから構成される分子である。ガングリオシドの種類と発現量は、細胞種、臓器種、動物種等によって異なる。さらに細胞が癌化する過程において、ガングリオシドの発現が量的および質的に変化することも知られている [Cancer Res., 45, 2405, (1985)]。

例えば、悪性度が高いといわれている神経外胚葉系腫瘍である神経芽細胞腫、肺小細胞癌およびメラノーマでは、正常細胞にはほとんど認められないガングリオシド GD2、GD3、GM2 等が発現していることが報告されており [Cancer Res., 45, 2405, (1985)、J. Exp. Med., 155, 1133, (1982)、J. Biol. Chem., 257, 12752, (1982)、Cancer Res., 47, 225, (1987)、Cancer Res., 47, 1098, (1987)、Cancer Res., 45, 2642, (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 5392, (1983)]、このような腫瘍細胞に特異的なガングリオシドに対する抗体はヒトの様々な癌の治療に有用であると考えられている。

一般にヒト以外の動物の抗体をヒトに投与すると、異物として認識され、副作用を惹起することや [J. Clin. Oncol., 2, 881, (1984)、Blood, 65, 1349, (1985)、J. Natl. Cancer Inst., 80, 932, (1988)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 1242, (1985)]、抗体の体内からの消失を速めることにより [Blood, 65, 1349, (1985)、J. Nucl. Med., 26, 1011,

(1985)、J. Natl. Cancer Inst., 80, 937, (1988)]、抗体の治療効果を減じてしまうことが知られている [J. Immunol., 135, 1530, (1985)、Cancer Res., 46, 6489, (1986)]。

これらの問題点を解決するために遺伝子組換え技術を利用して、ヒト以外の動物の抗体をヒト型キメラ抗体、あるいはヒト型 CDR 移植抗体などのヒト化抗体にすることが試みられている [Nature, 321, 522, (1986)]。ヒト化抗体は、ヒト以外の動物の抗体に比べ、免疫原性が低下し [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 4220, (1989)]、治療効果が延長することが報告されている [Cancer Res., 56, 1118, (1996)、Immunol., 85, 668, (1995)]。

ガングリオシド GM2 に対するヒト化抗体は、ヒトメラノーマの治療に有用であることが示されている [Lancet, 1, 786, (1989)]。ガングリオシド GM2 に特異的に反応し、抗体依存性細胞傷害活性（以下、ADCC 活性と記す）や補体依存性細胞傷害活性（以下、CDC 活性と記す）等の細胞傷害活性を有するヒト化抗体としては、ヒト IgG クラスのヒト型キメラ抗体およびヒト型 CDR 移植抗体が取得されている [W000/61739、W002/31140]。

また、ヒト化抗体は、遺伝子組換え技術を利用して作製するため、様々な形態の分子として作製することができる。例えば、エフェクター機能の高いヒト化抗体を作製することができる [Cancer Res., 56, 1118, (1996)]。

近年、Rituxan による非ホジキン白血病患者の治療、Herceptin による乳癌患者の治療において、該抗体医薬が患者のエフェクター細胞に強い ADCC 活性を惹起した場合には、より高い治療効果が得られている (Blood, 99, 754, 2002; J. Clin. Oncol., 21, 3940, 2003; Clin. Cancer Res., 10, 5650, 2004)。

ヒト IgG1 サブクラスの抗体は、その Fc 領域および抗体レセプター（以下、Fc $\gamma$ R と表記する）あるいは各種補体成分を介して、ADCC 活性および CDC 活性を発現する。抗体と Fc $\gamma$ R との結合においては、抗体のヒンジ領域及び C 領域の第 2 番目のドメイン（以下、C $\gamma$ 2 ドメインと表記する）に結合している糖鎖の重要性が示唆されている [Chem. Immunol., 65, 88, (1997)]。

抗体 IgG 分子の Fc 領域に結合している N-グリコシド結合複合型糖鎖の非還元末端へのガラクトースの付加、および還元末端の N-アセチルグルコサミンへのフコースの付加に関しては多様性があることが知られており [Biochemistry, 36, 130, (1997)]、特に糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンへのフコースの付加により、抗体の ADCC 活性が大きく低下す

ることが報告されている [W000/61739, J. Biol. Chem., 278, 3466, (2003)]。

一般に、医薬品として利用される抗体組成物の多くは、遺伝子組換え技術を用いて作製され、動物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞などを宿主細胞として製造されているが、発現させた抗体組成物の糖鎖構造は宿主細胞によって異なる。従って、最適な薬理活性が発揮できるような糖鎖が付加されている抗体組成物を適切に調製し提供することが質の高い医療を患者へ提供する上で欠かせない。

抗体生産細胞内の  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8)、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ (GMD)、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ (FX) の活性を低下または欠失することにより、Fc 領域を有する抗体分子からなる組成物中で、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を増加させることができる [W002/31140]。

#### 発明の開示

本発明の目的は、ガングリオシド GM2 に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体組成物、該抗体組成物を生産する形質転換体、該抗体組成物の製造方法および該抗体組成物を含有する医薬等を提供することにある。本発明の抗ガングリオシド GM2 抗体組成物は高い細胞傷害活性を有するため、ガングリオシド GM2 を発現した細胞を患者の体内から減少させる治療に有用である。高い細胞傷害活性を有する抗体を治療に用いることにより、化学療法、放射性同位元素標識体などと併用が不要となることから患者への副作用を軽減させることが期待される。また、患者への治療薬の投与量を減少させることで患者への負担の軽減などが期待される。

#### 課題を解決するための手段

本発明は、以下の (1) ~ (48) に関する。

(1) ガングリオシド GM2 に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有

- する遺伝子組換え抗体分子からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体組成物。
- (2) N-グリコシド結合複合型糖鎖が、該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合していない糖鎖である、(1)に記載の抗体組成物。
- (3) ガングリオシド GM2 発現細胞に特異的に結合する(1)または(2)に記載の抗体組成物。
- (4) ガングリオシド GM2 発現細胞に対し細胞傷害活性を示す(1)～(3)のいずれか1項に記載の抗体組成物。
- (5) ガングリオシド GM2 発現細胞に対し、非ヒト動物由来ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体よりも高い細胞傷害活性を示す(1)～(4)のいずれか1項に記載の抗体組成物。
- (6) 細胞傷害活性が抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性である(4)または(5)に記載の抗体組成物。
- (7) 細胞傷害活性が補体依存性細胞傷害(CDC)活性である(4)または(5)に記載の抗体組成物。
- (8) それぞれ配列番号14、15および16で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子重鎖(H鎖)可変領域(V領域)の相補性決定領域(CDR)1、CDR2、CDR3を含む、(1)～(7)のいずれか1項に記載の抗体組成物。
- (9) それぞれ配列番号17、18および19で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子軽鎖(L鎖)可変領域(V領域)の相補性決定領域(CDR)1、CDR2、CDR3を含む、(1)～(7)のいずれか1項に記載の抗体組成物。
- (10) それぞれ配列番号14、15および16で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子重鎖(H鎖)可変領域(V領域)の相補性決定領域(CDR)1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号17、18および19で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖(L鎖)V領域の相補性決定領域(CDR)1、CDR2、CDR3を含む、(1)～(9)のいずれか1項に記載の抗体組成物。
- (11) 遺伝子組換え抗体がヒト型キメラ抗体またはヒト型CDR移植抗体である(1)～(10)のいずれか1項に記載の抗体組成物。
- (12) ヒト型キメラ抗体がガングリオシド GM2 に特異的に結合するモノクローナル抗体

4) の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) を含む、  
(1 1) に記載の抗体組成物。

(1 3) 抗体分子の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 20 で示されるアミノ酸配列を含む (1 2) に記載の抗体組成物。

(1 4) 抗体分子の軽鎖 (L 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 21 で示されるアミノ酸配列を含む (1 2) に記載の抗体組成物。

(1 5) 抗体分子の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 20 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖 (L 鎖) V 領域が、配列番号 21 で示されるアミノ酸配列を含む (1 2) ~ (1 4) のいずれか 1 項に記載のヒト型キメラ抗体組成物。

(1 6) ヒト型 CDR 移植抗体がガングリオシド GM2 に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) を含む、  
(1 1) に記載の抗体組成物。

(1 7) ガングリオシド GM2 に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) とヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のフレームワーク領域 (FR) を含む、(1 6) に記載の抗体組成物。

(1 8) ガングリオシド GM2 に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) とヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のフレームワーク領域 (FR)、ならびにヒト抗体の H 鎖定常領域 (C 領域) および L 鎖 C 領域を含む、(1 6) または (1 7) に記載の抗体組成物。

(1 9) 抗体分子の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 22 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 22 で示されるアミノ酸配列のうち、38 番目の Arg、40 番目の Ala、43 番目の Gln および 44 番目の Gly のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(1 6) ~ (1 8) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(2 0) 抗体分子の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 23 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 23 で示されるアミノ酸配列のうち、67 番目の Arg、72 番目の Ala、84 番目の Ser および 98 番目の Arg のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(1 6) ~ (1 8) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(2 1) 抗体分子の軽鎖 (L 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 24 で示されるアミノ酸配列、

- 4) または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列のうち、15 番目の Val、35 番目の Tyr、46 番目の Leu、59 番目の Ser、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、72 番目の Phe および 76 番目の Ser から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(16) ~ (18) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(22) 抗体分子の軽鎖(L 鎖)可変領域(V 領域)が、配列番号 25 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 25 で示されるアミノ酸配列のうち、4 番目の Met、11 番目の Leu、15 番目の Val、35 番目の Tyr、42 番目の Ala、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、77 番目の Leu および 103 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(16) ~ (18) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(23) 抗体分子の重鎖(H 鎖)可変領域(V 領域)が、配列番号 22 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 22 で示されるアミノ酸配列のうち、38 番目の Arg、40 番目の Ala、43 番目の Gln および 44 番目の Gly から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖 (L 鎖) V 領域が、配列番号 24 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列のうち、15 番目の Val、35 番目の Tyr、46 番目の Leu、59 番目の Ser、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、72 番目の Phe および 76 番目の Ser から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(16) ~ (19) または (21) に記載の抗体組成物。

(24) 抗体分子の重鎖(H 鎖)可変領域(V 領域)が、配列番号 23 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 23 で示されるアミノ酸配列のうち、67 番目の Arg、72 番目の Ala、84 番目の Ser および 98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖 (L 鎖) V 領域が、配列番号 24 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列のうち、15 番目の Val、35 番目の Tyr、46 番目の Leu、59 番目の Ser、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、72 番目の Phe および 76 番目の Ser から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(16) ~ (18)、(20) または (21) に記載の抗体組成物。

(25) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 23 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 23 で示されるアミノ酸配列のうち、67 番目の Arg、72 番目の Ala、84 番目の Ser および 98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が、配列番号 25 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 25 で示されるアミノ酸配列のうち、4 番目の Met、11 番目の Leu、15 番目の Val、35 番目の Tyr、42 番目の Ala、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、77 番目の Leu および 103 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(16)～(18)、(20) または (22) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(26) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、それぞれ配列番号 22、23、26、27、28、29 および 30 で示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む、(16)～(20)、(23)～(25) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(27) 抗体分子の軽鎖(L鎖)可変領域(V領域)が、それぞれ配列番号 24、25、31、32、33、34 および 35 で示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む(16)～(18)、(21)～(25) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(28) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 22、23、26、27、28、29、30 で示されるから選ばれるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含み、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が、配列番号 24、25、31、32、33、34 および 35 で示されるアミノ酸配列から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む(16)～(27) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(29) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 26 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が配列番号 31 または 32 で示されるアミノ酸配列を含む(16)～(19)、(21)、(23)、(26)～(28) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(30) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 22 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が配列番号 32 または 35 で示されるアミノ酸配列を含む(16)～(19)、(21)～(23)、(26)～(28) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(31) ガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体分子をコードする DNA を宿主細胞に導入して得られる、(1) ～ (30) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物を生産する形質転換体。

(32) 宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素、または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素を失活するようにゲノムが改変された細胞である、(31) に記載の形質転換体。

(33) 宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素、または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム上の対立遺伝子のすべてがノックアウトされた細胞である、(31) に記載の形質転換体。

(34) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ (GMD) または GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ (Fx) から選ばれる酵素である、(32) または (33) に記載の形質転換体。

(35) GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の (a) および (b) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、(34) に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(36) GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の (a) ～ (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(34) に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質。

(37) GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の (a) および



(b) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、(34) に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 3 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 3 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(38) GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の (a)~(c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(34) に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質。

(39) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素が  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼである (32) または (33) に記載の形質転換体。

(40)  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)~(d) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、(39) に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 5 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 6 で表される塩基配列からなる DNA ;

(c) 配列番号 5 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA ;

(d) 配列番号 6 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(41)  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)~(f) からなる群から選ばれる蛋白質である、(39) に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(c) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(d) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(e) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(f) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

(4 2) 形質転換体が FERM BP-8470 である (4 1) に記載の形質転換体。

(4 3) 宿主細胞が、下記の(a)～(i)からなる群から選ばれる細胞である (3 1) ～ (4 2) のいずれか 1 項に記載の形質転換体。

(a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞；

(b) ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL. P2. G11. 16Ag. 20 細胞；

(c) マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞；

(d) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞；

(e) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；

(f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；

(g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；

(h) 胚性幹細胞；

(i) 受精卵細胞。

(4 4) (3 1) ～ (4 3) のいずれか 1 項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該抗体組成物を採取し、精製する、(1) ～ (3 0) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物の製造方法。

(4 5) (4 4) に記載の製造方法により得られる、(1) ～ (3 2) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

(4 6) (1) ～ (3 0) および (4 5) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物を有効成分

として含有する医薬。

(47) (1) ~ (30) および (45) のいずれか1項に記載の抗体組成物を有効成分として含有するガングリオシド GM2 関連疾患の治療薬。

(48) ガングリオシド GM2 関連疾患が癌である (47) に記載の治療薬。

以下、本発明を詳細に説明する。本願は、2003 年 10 月 9 日に出願された日本国特許出願 2003-350168 号および 2004 年 4 月 26 日に出願された日本国特許出願 2004-129431 号の優先権を主張するものであり、当該特許出願の明細書及び図面に記載される内容を包含する。

#### 発明を実施するための最良の形態

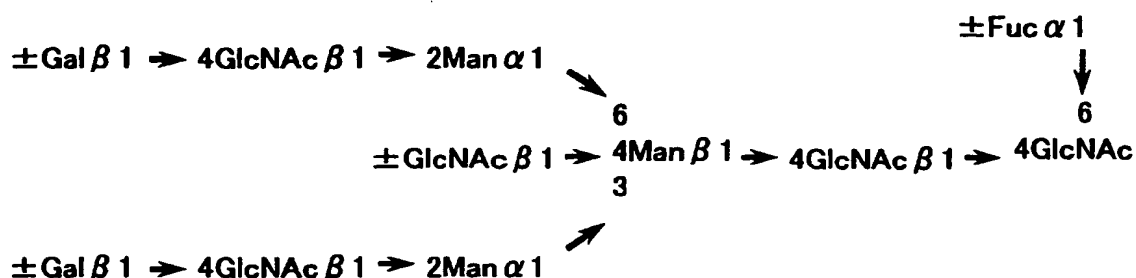
本発明のガングリオシド GM2 に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる抗体組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体組成物としては、該 N-グリコシド結合複合型糖鎖が、該糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖である抗体組成物があげられる。

抗体分子には Fc 領域があり、それらの領域には N-グリコシド結合糖鎖が結合する。従って、抗体 1 分子あたり 2 本の糖鎖が結合している。

N-グリコシド結合糖鎖としては、コア構造の非還元末端側にガラクトース-N-アセチルグルコサミン（以下、Gal-GlcNAc と表記する）の側鎖を並行して 1 ないしは複数本有し、更に Gal-GlcNAc の非還元末端側にシアル酸、バイセクティングの N-アセチルグルコサミンなどを有するコンプレックス型（複合型）糖鎖をあげることができる。

本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖としては、下記化学式 1 で示される。

# 化学式1



本発明において、フコースが結合していない糖鎖としては、上記で示された化学式中、還元末端側の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合されていないものであればよく、非還元末端の糖鎖の構造はいかなるものでもよい。

したがって、本発明の抗体組成物としては、上記の糖鎖構造を有していれば、単一の糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよいし、複数の異なる糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよい。

本発明において、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していないとは、実質的にフコースが結合していないことをいう。実質的にフコースが結合していない抗体組成物とは、具体的には、後述の 4 に記載の糖鎖分析において、フコースが実質的に検出できない程度の抗体組成物である場合をいう。実質的に検出できない程度とは、測定の実出限界以下であることを意味する。糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない本発明の抗体組成物は、高い ADCC 活性を有する。

N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物中に含まれる、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖を有する抗体分子の割合は、抗体分子からヒドラジン分解や酵素消化などの公知の方法[生物化学実験法 23—糖蛋白質糖鎖研究法（学会出版センター）高橋禮子編（1989）]を用い、糖鎖を遊離させ、遊離させた糖鎖を蛍光標識又は同位元素標識し、標識した糖鎖をクロマトグラフィー法にて分離

することによって決定することができる。また、遊離させた糖鎖を HPAED-PAD 法 [J. Liq. Chromatogr., 6, 1577 (1983)] によって分析することで決定することができる。

本発明の抗体組成物としては、ガングリオシド GM2 発現細胞に対し、細胞傷害活性を有する抗体組成物が好ましい。

ガングリオシド GM2 発現細胞としては、ガングリオシド GM2 が発現している細胞であればいかなるものでもよい。

細胞傷害活性としては、補体依存性細胞傷害活性(以下、CDC 活性と記す)あるいは抗体依存性細胞傷害活性(以下、ADCC 活性と記す)などがあげられる。

本発明のガングリオシド GM2 発現細胞に対し細胞傷害活性を有する抗体組成物は、該抗体組成物の有する細胞傷害活性によりガングリオシド GM2 発現細胞を傷害することにより、該細胞が関与する肺小細胞癌、メラノーマ、神経芽細胞腫などの疾患を治療できる。

本発明の抗体組成物は、ヒト型キメラ抗体組成物、ヒト型 CDR 移植抗体組成物およびヒト抗体組成物、ならびにそれらの抗体断片組成物を包含する。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL とヒト抗体の CH および CL とからなる抗体をいう。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

本発明のヒト型キメラ抗体組成物は、ガングリオシド GM2 に特異的に反応するヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得し、ヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

本発明のヒト型キメラ抗体組成物の製造に用いるヒト以外の動物の抗体としては、具体的には、特開平 4-311385 に記載のマウスモノクローナル抗体 KM690、マウスモノクローナル抗体 KM750 およびマウスモノクローナル抗体 KM796、Cancer Res., 46, 4116, (1986) に記載のモノクローナル抗体 MoAb5-3、Cancer Res., 48, 6154, (1988) に記載のモノクローナル抗体 MK1-16、モノクローナル抗体 MK2-34、J. Biol. Chem., 264, 12122, (1989) に記載のモノクローナル抗体 DMAb-1 などがあげられる。また、ヒト抗体ではあるが、IgM クラスである Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 79, 7629, (1982) に記載のモノクローナル抗体なども本発明のヒト型キメラ抗体組成物の製造に用いられる。

本発明において、ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIgと表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、さらにhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のCLとしては、hIgに属すればいずれのものでもよく、 $\kappa$ クラスあるいは $\lambda$ クラスのものを用いることができる。

本発明のガングリオシドGM2に特異的に結合するヒト型キメラ抗体組成物としては、それぞれ配列番号14、15および16で示されるアミノ酸配列からなるVHのCDR1、CDR2、CDR3および／またはそれぞれ配列番号17、18および19で示されるアミノ酸配列からなるVLのCDR1、CDR2、CDR3、を含む抗ガングリオシドGM2キメラ抗体組成物、抗体のVHが配列番号20で示されるアミノ酸配列および／またはVLが配列番号21で示されるアミノ酸配列を含む抗ガングリオシドGM2キメラ抗体組成物、抗体のVHが配列番号20で示されるアミノ酸配列およびヒト抗体のCHがhIgG1サブクラスのアミノ酸配列からなり、抗体のVLが配列番号21で示されるアミノ酸配列およびヒト抗体のCLが $\kappa$ クラスのアミノ酸配列からなる抗ガングリオシドGM2キメラ抗体組成物などがあげられる。

本発明のガングリオシドGM2に特異的に結合するヒト型キメラ抗体組成物が有するアミノ酸配列としては、具体的には、W000/61739に記載のKM966が有するアミノ酸配列などがあげられる。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRをヒト抗体のVHおよびVLの適切な位置に移植した抗体を意味する。

本発明のヒト型CDR移植抗体組成物は、ガングリオシドGM2に特異的に反応するヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRを任意のヒト抗体のVHおよびVLのFRに移植したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のH鎖C領域（以下、CHと表記する）およびL鎖C領域（以下、CLと表記する）をコードするDNAを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

本発明のヒト型CDR移植抗体組成物の製造に用いるヒト以外の動物の抗体としては、具体的には、特開平4-311385に記載のマウスモノクローナル抗体KM690、マウスモノクローナル抗体KM750およびマウスモノクローナル抗体KM796、Cancer Res., 46, 4116, (1986)に記載

のモノクローナル抗体 MoAb5-3、Cancer Res., 48, 6154, (1988)に記載のモノクローナル抗体 MK1-16、モノクローナル抗体 MK2-34、J. Biol. Chem., 264, 12122, (1989)に記載のモノクローナル抗体 DMAB-1 などがあげられる。また、ヒト抗体ではあるが、IgM クラスである Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 79, 7629, (1982)に記載のモノクローナル抗体なども本発明のヒト型 CDR 移植抗体組成物の製造に用いられる。

ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のアミノ酸配列であれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank などのデータベースに登録されているヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列、またはヒト抗体の VH および VL の FR の各サブグループの共通アミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) などがあげられる。

本発明において、ヒト型 CDR 移植抗体の CH としては、ヒトイムノグロブリン (以下、hIg と表記する) に属すればいかなるものでもよいが、hIgG クラスのものが好適であり、さらに hIgG クラスに属する hIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4 といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型 CDR 移植抗体の CL としては、hIg に属すればいずれのものでもよく、 $\kappa$  クラスあるいは  $\lambda$  クラスのものを用いることができる。

本発明のヒト型 CDR 移植抗体組成物としては、ガングリオシド GM2 に特異的に反応するヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物があげられるが、好ましくは、それぞれ配列番号 14、15、16 で示されるアミノ酸配列からなる抗体 VH の CDR1、CDR2、CDR3 および/またはそれぞれ配列番号 17、18、19 で示されるアミノ酸配列からなる VL の CDR1、CDR2、CDR3 を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物または該抗体断片組成物などがあげられる。

これらのヒト型 CDR 移植抗体組成物なかでも、抗体の VH が配列番号 22 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 22 で示されるアミノ酸配列のうち、38 番目の Arg、40 番目の Ala、43 番目の Gln および 44 番目の Gly のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、抗体の VH が配列番号 23 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 23 で示されるアミノ酸配列のうち、67 番目の Arg、72 番目の Ala、84 番目の Ser および 98 番目の Arg のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、抗体の VL が配

列番号 24 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列のうち、15 番目の Val、35 番目の Tyr、46 番目の Leu、59 番目の Ser、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、72 番目の Phe および 76 番目の Ser から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、抗体の VL が配列番号 25 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 25 で示されるアミノ酸配列のうち、4 番目の Met、11 番目の Leu、15 番目の Val、35 番目の Tyr、42 番目の Ala、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、77 番目の Leu および 103 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物が好ましく、抗体の VH が配列番号 22 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 22 で示されるアミノ酸配列のうち、38 番目の Arg、40 番目の Ala、43 番目の Gln および 44 番目の Gly のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体の VL が配列番号 24 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列のうち、15 番目の Val、35 番目の Tyr、46 番目の Leu、59 番目の Ser、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、72 番目の Phe および 76 番目の Ser から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、抗体の VH が配列番号 23 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 23 で示されるアミノ酸配列のうち、67 番目の Arg、72 番目の Ala、84 番目の Ser および 98 番目の Arg のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体の VL が配列番号 24 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列のうち、15 番目の Val、35 番目の Tyr、46 番目の Leu、59 番目の Ser、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、72 番目の Phe および 76 番目の Ser から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、抗体の VH が配列番号 23 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 23 で示されるアミノ酸配列のうち、67 番目の Arg、72 番目の Ala、84 番目の Ser および 98 番目の Arg のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体の VL が配列番号 25 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 25 で示されるアミノ酸配列のうち、4 番目の Met、11 番目の Leu、15 番目の Val、35 番目の Tyr、42 番目の Ala、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、



77 番目の Leu および 103 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、がより好ましい。

具体的には、抗体の VH がそれぞれ配列番号 22、23、26、27、28、29、30 で示されるアミノ酸配列から選ばれる 1 つのアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体、VL がそれぞれ配列番号 24、25、31、32、33、34、35 で示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、抗体の VH がそれぞれ配列番号 22、23、26、27、28、29、30 で示されるアミノ酸配列から選ばれる 1 つのアミノ酸配列を含み、かつ、VL がそれぞれ配列番号 24、25、31、32、33、34、35 で示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、より具体的には、VH が配列番号 26 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、VL が配列番号 31 または 32 で示されるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、VH が配列番号 22 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、VL が配列番号 32 または 35 で示されるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物があげられる。

本発明のヒト型 CDR 移植抗体組成物としては、VH が配列番号 26 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、VL が配列番号 31 で示されるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物、VH が配列番号 22 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、VL が配列番号 32 で示されるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体組成物が最も好ましい。

本発明のヒト型 CDR 移植抗体組成物が有するアミノ酸配列の具体例としては、それぞれ特開平 10-257893 に記載の形質転換株 KM8966 (FERM BP-5105) が生産する KM8966、形質転換株 KM8967 (FERM BP-5106) が生産する KM8967、形質転換株 KM8969 (FERM BP-5527) が生産する KM8969、形質転換株 KM8970 (FERM BP-5528) が生産する KM8970 が有するアミノ酸配列などがあげられる。

これらのアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、付加、置換または挿入され、かつガングリオシド GM2 と特異的に結合する抗体または抗体断片も本発明の抗体組成物に包含される。

本発明の抗体組成物のアミノ酸配列において欠失、置換、挿入および/または付加されるアミノ酸の数は 1 個以上でありその数は特に限定されないが、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315

(1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、1～数十個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個である。

本発明の抗体組成物のアミノ酸配列において1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたとは、同一配列中の任意かつ1もしくは複数のアミノ酸配列中において、1または複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入または付加があることを意味し、欠失、置換、挿入または付加が同時に生じてよく、置換、挿入または付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型とを問わない。天然型アミノ酸残基としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-システインなどがあげられる。

以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、 $\epsilon$ -ブチルグリシン、 $\epsilon$ -ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G群：フェニルアラニン、チロシン

本発明の遺伝子組換え抗体断片組成物は、ガングリオシド GM2 に特異的に結合する遺伝子組換え抗体の抗体断片からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体Fc領域の一

部または全部を含んでいる抗体断片組成物である。

本発明の抗体断片組成物としては、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、diabody、dsFv および CDR を含むペプチドなどの抗体断片組成物があげられるが、該抗体断片組成物に抗体の Fc 領域の一部または全部を含まない場合は、該抗体断片と、N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖を有する抗体 Fc 領域の一部または全部との融合蛋白質とすればよいと融合させるか、または該 Fc 領域の一部または全部を含む、蛋白質との融合蛋白質組成物とすればよい。

Fab は、IgG を蛋白質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち（H 鎖の 224 番目のアミノ酸残基で切断される）、H 鎖の N 末端側約半分と L 鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約 5 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の Fab は、本発明のガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体組成物を蛋白質分解酵素パパインで処理して得ることができる。または、該抗体の Fab をコードする DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fab を製造することができる。

F(ab')<sub>2</sub> は、IgG を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（H 鎖の 234 番目のアミノ酸残基で切断される）、Fab がヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約 10 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の F(ab')<sub>2</sub> は、本発明のガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体組成物を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記の Fab' をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することができる。

Fab' は、上記 F(ab')<sub>2</sub> のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約 5 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の Fab' は、本発明のガングリオシド GM2 に特異的に結合する F(ab')<sub>2</sub> 組成物を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体の Fab' 断片をコードする DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fab' を製造することができる。

scFv は、1 本の VH と 1 本の VL とを適当なペプチドリンカー（以下、P と表記する）を用いて連結した、VH-P-VL ないしは VL-P-VH ポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片

である。

本発明の scFv は、本発明のガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体組成物の VH および VL をコードする cDNA を取得し、scFv をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、scFv を製造することができる。

diabody は、scFv が二量体化した抗体断片で、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。二価の抗原結合活性は、同一であることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。

本発明の diabody は、本発明のガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体組成物の VH および VL をコードする cDNA を取得し、scFv をコードする DNA を P のアミノ酸配列の長さが 8 残基以下となるように構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、diabody を製造することができる。

dsFv は、VH および VL 中のそれぞれ 1 アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は Reiter らにより示された方法 (Protein Engineering, 7, 697-704, 1994) に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

本発明の dsFv は、本発明のガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体組成物の VH および VL をコードする cDNA を取得し、dsFv をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、dsFv を製造することができる。

CDR を含むペプチドは、VH または VL の CDR の少なくとも 1 領域以上を含んで構成される。複数の CDR を含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。

本発明の CDR を含むペプチドは、本発明のガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体組成物の VH および VL の CDR をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、CDR を含むペプチドを製造することができる。

また、CDRを含むペプチドは、Fmoc 法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc 法（t-ブチルオキシカルボニル法）などの化学合成法によって製造することもできる。

本発明の形質転換体としては、ガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体分子をコードする DNA を宿主細胞に導入して得られる形質転換体であって、本発明の抗体組成物を生産する形質転換体であればいかなる形質転換体でも包含される。具体的な例としては、ガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体分子をコードする DNA を以下の(a)または(b)などの宿主細胞に導入して得られる形質転換体があげられる。

(a) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が失活するようにゲノムが改変された細胞；

(b) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素が失活するようにゲノムが改変された細胞。

上述において、酵素が失活するようにゲノムが改変されたとは、該酵素の発現を欠失させるように該酵素をコードする遺伝子の発現調節領域に変異を導入したり、または該酵素を失活させるように該酵素をコードする遺伝子のアミノ酸配列に変異を導入することをいう。変異を導入するとは、ゲノム上の塩基配列を欠失、置換、挿入および／または付加させるといった塩基配列の改変を行うことをいう。このように改変されたゲノム遺伝子の発現または活性が完全に抑制されることをゲノム遺伝子がノックアウトされるという。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ (GMD)、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ (Fx) などがあげられる。

GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼとしては、

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA；などがあげられる。

GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼとしては、

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿

入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質；  
などがあげられる。

GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼとしては、

(a) 配列番号 3 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 3 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA；

などがあげられる。

GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼとしては、

(a) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質；  
などがあげられる。

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼがあげられる。

本発明において、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼとしては、下記(a)、(b)、(c)または(d)の DNA がコードする蛋白質、

(a) 配列番号 5 で表される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 6 で表される塩基配列からなる DNA

(c) 配列番号 5 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA

(d) 配列番号 6 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha 1, 6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA または、

(e) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(f) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(g) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha 1, 6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(h) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha 1, 6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(i) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha 1, 6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(j) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha 1, 6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質  
等があげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素のアミノ酸配列をコードする DNA としては、配列番号 1 または 3 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 1 または 3 で表される塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素活性を有する蛋白質をコードする DNA などがあげられる。

$\alpha 1, 6$ -フコシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列をコードする DNA としては、配列番号 5 または 6 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 5 または 6 で表される塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha 1, 6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA などがあげられる。

本発明において、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA とは、例えば配列番号 1、3、5 または 6 で表される塩基配列からなる DNA などの DNA またはその一部の断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイゼーション

ン法あるいはサザンハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られる DNA を意味し、具体的には、コロニーあるいはプラーク由来の DNA を固定化したフィルターを用いて、0.7～1M の塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2 倍濃度の SSC 溶液（1 倍濃度の SSC 溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できる DNA をあげることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能な DNA として具体的には、配列番号 1、3、5 または 6 で表される塩基配列と少なくとも 60%以上の相同性を有する DNA、好ましくは 70%以上、より好ましくは 80%以上、さらに好ましくは 90%以上、特に好ましくは 95%以上、最も好ましくは 98%以上の相同性を有する DNA をあげることができる。

本発明において、配列番号 2 または 4 で表されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素活性を有する蛋白質、または配列番号 7 または 8 で表されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば、配列番号 1、3、5 または 6 で表される塩基配列を有する DNA に部位特異的変異を導入することにより取得することができる。欠失、置換、挿入および／または付加されるアミノ酸の数は 1 個以上でありその数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、1～数十個、好ましくは 1～20 個、より好ましくは 1～10 個、さらに好ましくは 1～5 個である。



また、本発明において配列番号 2、4、7 または 8 であらわされるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性、または  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質としては、具体的には、それぞれ配列番号 2、4、7 または 8 で表されるアミノ酸配列と BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] や FASTA [Methods in Enzymology, 183, 63 (1990)] 等の解析ソフトを用いて計算したときに、少なくとも 80% 以上、好ましくは 85% 以上、より好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 95% 以上、特に好ましくは 97% 以上、最も好ましくは 99% 以上の相同性を有する蛋白質などをあげることができる。

また、本発明に用いられる宿主細胞、すなわち細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素、または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が欠失した宿主細胞を取得する方法としては、目的とする酵素を失活させることができる手法であれば、いずれの手法でも用いることができる。上述の酵素を失活させる手法としては、

- (a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；
- (b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；
- (c) 酵素についての突然変異を導入する手法；
- (d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法；

(e) N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法などがあげられる。

N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンとしては、該糖鎖構造を認識できるレクチンであれば、いずれのレクチンでも用いることができる。その具体的な例としては、レンズマメレクチン LCA (Lens Culinaris 由来の Lentil Agglutinin)、エンドウマメレクチン PSA (Pisum sativum 由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチン VFA (Vicia faba 由来の Agglutinin)、ヒイロチャワンタケレクチン AAL (Aleuria aurantia 由来の Lectin) 等を挙げることができる。

レクチンに耐性な細胞とは、レクチンを有効濃度与えたときにも、生育が阻害されない細

胞を言う。有効濃度とは、ゲノム遺伝子が改変される以前の細胞（以下、親株とも称す）が正常に生育できない濃度以上であり、好ましくは、ゲノム遺伝子が改変される以前の細胞が生育できない濃度と同濃度、より好ましくは2～5倍、さらに好ましくは10倍、最も好ましくは20倍以上である。

生育が阻害されないレクチンの有効濃度は、細胞株に応じて適宜定めればよく、通常のレクチンの有効濃度は10  $\mu$ g/mL～10mg/mL、好ましくは0.5mg/mL～2mg/mLである。

本発明の抗体組成物を生産させる宿主細胞としては、本発明の抗体組成物を発現できる上記宿主細胞であればいかなる細胞も包含する。例えば、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などがあげられる。これらの細胞としては、後述1に記載のものがあげられ、特に、動物細胞の中でも、チャイニーズハムスター卵巣組織由来のCHO細胞、ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞、マウスミエローマ細胞株NS0細胞、マウスミエローマ細胞株SP2/0-Ag14細胞、シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞、抗体を産生するハイブリドーマ細胞、ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞などが好ましい。

本発明の形質転換体としては、具体的には、本発明の抗ガングリオシドGM2抗体の遺伝子を組み込んだチャイニーズハムスター卵巣組織由来のCHO細胞株CHO/DG44細胞由来の形質転換株Ms705/GM2があげられる。なお、CHO細胞株CHO/DG44細胞由来の形質転換株Ms705/GM2は、平成15年9月9日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）にFERM BP-8470として寄託されている。

以下に、本発明の抗体組成物を生産する細胞の作製方法、本発明の抗体組成物の製造方法および本発明の抗体組成物の分析方法ならびに利用方法について説明する。

#### 1. 本発明の抗体組成物を生産する細胞の作製

本発明の抗体組成物を生産する細胞（以下、本発明の細胞と称する）は、以下に述べる手法により、本発明の抗体組成物を生産するために用いる宿主細胞を作製し、該宿主細胞に後述2に記載の方法により、抗ガングリオシドGM2抗体をコードする遺伝子を導入することにより、作製することができる。

##### （1）酵素の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法

本発明の抗体組成物を生産する細胞（以下、本発明の細胞と称す）の作製のために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド

結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、遺伝子破壊の方法を用いることにより作製することができる。細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ（以下、GMD と表記する）、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ（以下、Fx と表記する）などがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。

ここでいう遺伝子とは、DNA または RNA を含む。

遺伝子破壊の方法としては、標的とする酵素の遺伝子を破壊することができる方法であればいかなる方法も包含される。その例としては、アンチセンス法、リボザイム法、相同組換え法、RNA-DNA オリゴヌクレオチド法（以下、RDO 法と表記する）、RNA インターフェアレンス法（以下、RNAi 法と表記する）、レトロウイルスを用いた方法、トランスポゾンを用いた方法等があげられる。以下これらを具体的に説明する。

(a) アンチセンス法又はリボザイム法による本発明の細胞を作製するための宿主細胞の作製

本発明の細胞の作製のために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素遺伝子を標的とし、細胞工学、12, 239 (1993)、BIO/TECHNOLOGY, 17, 1097 (1999)、Hum. Mol. Genet., 5, 1083 (1995)、細胞工学、13, 255 (1994)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96, 1886 (1999)等に記載されたアンチセンス法またはリボザイム法を用いて、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする cDNA あるいはゲノム DNA を調製する。

調製した cDNA あるいはゲノム DNA の塩基配列を決定する。

決定した DNA の配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの

1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする DNA 部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さのアンチセンス遺伝子またはリボザイムを設計する。

該アンチセンス遺伝子、またはリボザイムを細胞内で発現させるために、調製した DNA の断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞を得ることができる。また、細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造または産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の抗体組成物を作製のために用いる宿主細胞を得ることもできる。

本発明の抗体組成物を作製するために用いられる宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述 2 に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製が可能であるか、ないしは染色体中への組み込みが可能で、設計したアンチセンス遺伝子、またはリボザイムを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述 2 に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入方法としては、後述 2 に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、以下の方法があげられる。

## 形質転換体を選択する方法

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素が失活した細胞を選択する方法としては、文献 [新生化学実験講座 3—糖質 I, 糖蛋白質 (東京化学同人) 日本生化学会編 (1988)]、文献 [細胞工学, 別冊, 実験プロトコールシリーズ, グライコバイオロジー実験プロトコール, 糖蛋白質・糖脂質・プロテオグリカン (秀潤社製) 谷口直之・鈴木明美・古川清・菅原一幸監修 (1996)]、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) 等に記載された生化学的な方法あるいは遺伝子工学的な方法などを用いて、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を測定する方法があげられる。生化学的な方法としては、例えば、酵素特異的な基質を用いて酵素活性を評価する方法があげられる。遺伝子工学的な方法としては、例えば、酵素遺伝子の mRNA 量を測定するノーザン解析や RT-PCR 法等があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述 1 の (5) に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述 4 または後述 5 に記載の方法があげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする cDNA を調製する方法としては、例えば、下記に記載の方法があげられる。

### cDNA の調製方法

各種宿主細胞の組織又は細胞から全 RNA 又は mRNA を調製する。

調製した全 RNA 又は mRNA から cDNA ライブラリーを作製する。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のアミノ酸配列に基づいて、デジェネレイティブプライマーを作製し、作製した

cDNA ライブラリーを鋳型として PCR 法で細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得する。

取得した遺伝子断片をプローブとして用い、cDNA ライブラリーをスクリーニングし、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする DNA を取得することができる。

ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞の mRNA は市販のもの(例えば Clontech 社)を用いてもよいし、以下のようにしてヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から調製してもよい。

ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から全 RNA を調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)]、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987); 実験医学, 9, 1937 (1991)] などがあげられる。

また、全 RNA から poly(A)+ RNA として mRNA を調製する方法としては、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] などがあげられる。

さらに、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia 社) などの市販のキットを用いることにより mRNA を調製することができる。

調製したヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞 mRNA から cDNA ライブラリーを作製する。cDNA ライブラリー作製法としては、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、A Laboratory Manual, 2 nd Ed. (1989)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えば SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (Life Technologies 社)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE 社)を用いる方法などがあげられる。

cDNA ライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌 K12 株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用でき

る。具体的には、ZAP Express [STRATAGENE 社、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、 $\lambda$  ZAP II (STRATAGENE 社)、 $\lambda$  gt10、 $\lambda$  gt11 [DNA cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、 $\lambda$  TriplEx (Clontech 社)、 $\lambda$  ExCell (Pharmacia 社)、pT7T318U (Pharmacia 社)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)] および pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)] 等をあげることができる。

cDNA ライブラリーを作製するための宿主微生物としては、微生物であればいずれでも用いることができるが、好ましくは大腸菌が用いられる。具体的には、*Escherichia coli* XL1-Blue MRF' [STRATAGENE 社、Strategies, 5, 81 (1992)]、*Escherichia coli* C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、*Escherichia coli* Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、*Escherichia coli* Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、*Escherichia coli* NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、*Escherichia coli* K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)] および *Escherichia coli* JM105 [Gene, 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

cDNA ライブラリーは、そのまま以降の解析に用いてもよいが、不完全長 cDNA の割合を下げて、完全長 cDNA を効率よく取得するために、菅野らが開発したオリゴキャップ法 [Gene, 138, 171 (1994)、Gene, 200, 149 (1997)、蛋白質核酸酵素, 41, 603 (1996); 実験医学, 11, 2491 (1993); cDNA クローニング(羊土社)(1996); 遺伝子ライブラリーの作製法(羊土社)(1994)] を用いて調製して以下の解析に用いてもよい。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のアミノ酸配列に基づいて、該アミノ酸配列をコードすることが予測される塩基配列の 5' 末端および 3' 末端の塩基配列に特異的なデジェネレイティブプライマーを作製し、作製した cDNA ライブラリーを鋳型として PCR 法 [PCR Protocols, Academic Press (1990)] を用いて DNA の増幅を行うことにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得することができる。

取得した遺伝子断片が細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$

結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする DNA であることは、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463 (1977)] あるいは ABI PRISM377DNA シークエンサー (Applied Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

該遺伝子断片をプローブとして、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれる mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリーからコロニーハイブリダイゼーションやプラークハイブリダイゼーション [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] 等を用いて、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の DNA を取得することができる。

また、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得するために用いたプライマーを使用し、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれる mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリーを鋳型として、PCR 法を用いて増幅することにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA を取得することもできる。

取得した細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする DNA の塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463 (1977)] あるいは ABI PRISM377DNA シークエンサー (Applied Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該 DNA の塩基配列を決定することができる。

決定した cDNA の塩基配列をもとに、BLAST 等の相同性検索プログラムを用いて、Genbank、EMBL および DDBJ などの塩基配列データベースを検索することにより、取得した DNA がデー



タペース中の遺伝子の中で細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードしている遺伝子であることを確認することもできる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号 1 または 3 に記載の塩基配列があげられる。

上記の方法で得られる N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号 5 または 6 に記載の塩基配列があげられる。

決定された DNA の塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用した DNA 合成機 model 392 (Perkin Elmer 社製) 等の DNA 合成機で化学合成することにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA を取得することもできる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を調製する方法としては、例えば、以下に記載の方法があげられる。

#### ゲノム DNA の調製方法

ゲノム DNA を調製する方法としては、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) 等に記載された公知の方法があげられる。また、ゲノム DNA ライブラリースクリーニングシステム (Genome Systems 社) や Universal GenomeWalker™ Kits (CLONTECH 社) などを用いることにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を取得することもできる。

取得した細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結

合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする DNA の塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc.

Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463 (1977)] あるいは ABI PRISM377DNA シークエンサー (Applied Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該 DNA の塩基配列を決定することができる。

決定したゲノム DNA の塩基配列をもとに、BLAST 等の相同性検索プログラムを用いて、Genbank、EMBL および DDBJ などの塩基配列データベースを検索することにより、取得した DNA がデータベース中の遺伝子の中で細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードしている遺伝子であることを確認することもできる。

決定された DNA の塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用した DNA 合成機 model 392 (Perkin Elmer 社製) 等の DNA 合成機で化学合成することにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を取得することもできる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素のゲノム DNA の塩基配列としては、例えば配列番号 9、10、11 および 12 に記載の塩基配列があげられる。

上記の方法で得られる N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA の塩基配列としては、例えば配列番号 13 に記載の塩基配列があげられる。

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の塩基配列に基づいて設計したアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを、直接宿主細胞に導入することで、本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞を得ることもできる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムは、公知の方法または DNA 合成機により調製することができる。具体的には、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする cDNA およびゲノム DNA の塩基配列のうち、連続した 5~150 塩基、好ましくは 5~60 塩基、より好ましくは 10~40 塩基に相当する配列を有するオリゴヌクレオチドの配列情報に基づき、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド）または該オリゴヌクレオチドの配列を含むリボザイムを合成して調製することができる。

オリゴヌクレオチドとしては、オリゴ RNA および該オリゴヌクレオチドの誘導体（以下、オリゴヌクレオチド誘導体という）等があげられる。

オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合が N3'-P5' ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C-5 プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C-5 チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンが C-5 プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン（phenoxazine-modified cytosine）で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが 2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが 2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等があげられる [細胞工学, 16, 1463 (1997)]。

#### （b）相同組換え法による本発明の抗体組成物を作製するための宿主細胞の作製

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、染色体上の標的遺伝子を相同組換え法を用いて染色体を改変することによって作製すること

ができる。

染色体上の標的遺伝子の改変は、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲティング, ES 細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995) (以下、「ES 細胞を用いた変異マウスの作製」と略す) 等に記載の方法を用い、例えば以下のように行うことができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を調製する。

ゲノム DNA の塩基配列にも基づき、改変する標的遺伝子 (例えば、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の構造遺伝子、あるいはプロモーター遺伝子) を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。

作製したターゲットベクターを宿主細胞に導入し、染色体上の標的遺伝子とターゲットベクターの間で相同組換えを起こした細胞を選択することにより、本発明の細胞の作製のために用いる宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述 2 に記載の宿主細胞があげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を調製する方法としては、上記 1 の (1) の (a) に記載のゲノム DNA の調製方法などがあげられる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 9、10、11 および 12 に記載の塩基配列があげられる。

上記の方法で得られる N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 13 に記載の塩基配列があげられる。

染色体上の標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲッティング, ES 細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲットベクターは、置換型、挿入型いずれでも用いることができる。

各種宿主細胞へのターゲットベクターの導入には、後述 3 に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲッティング, ES 細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリ A 選択などの方法を用いることができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノム DNA に対するサザンハイブリダイゼーション法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] や PCR 法 [PCR Protocols, Academic Press (1990)] 等があげられる。

#### (c) RDO 方法による本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞の作製

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、RDO 法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA あるいはゲノム DNA を上記 1 の (1) の (a) に記載の方法を用い、調製する。

調製した cDNA あるいはゲノム DNA の塩基配列を決定する。

決定した DNA の配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さの RDO のコンストラクトを設計し合成する。

合成した RDO を宿主細胞に導入し、標的とした酵素、すなわち細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素に変異が生じた形質転換体を選択することにより、本発明の宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述 2 に記載の宿主細胞があげられる。

各種宿主細胞への RDO の導入には、後述 2 に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA を調製する方法としては、例えば、上記 1 の (1) の (a) に記載の cDNA の調製方法などがあげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を調製する方法としては、例えば、上記 1 の (1) の (b) に記載のゲノム DNA の調製方法などがあげられる。

DNA の塩基配列は、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) 等のプラスミドにサブクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、ABI PRISM377DNA シークエンサー (Applied Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

る。

RDO は、常法または DNA 合成機を用いることにより調製することができる。

RDO を宿主細胞に導入し、標的とした酵素、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子に変異が生じた細胞を選択する方法としては、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) 等に記載された染色体上の遺伝子の変異を直接検出する方法があげられる。

また、前記 1 の (1) の (a) に記載の、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法、後述 1 の (5) に記載の細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法、あるいは、後述 4 または後述 5 に記載の産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法も用いることができる。

RDO は、Science, 273, 1386 (1996); Nature Medicine, 4, 285 (1998); Hepatology, 25, 1462 (1997); Gene Therapy, 5, 1960 (1999); J. Mol. Med., 75, 829 (1997); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 8774 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 8768 (1999); Nuc. Acids. Res.), 27, 1323 (1999); Invest. Dermatol., 111, 1172 (1998); Nature Biotech.), 16, 1343 (1998); Nature Biotech., 18, 43 (2000); Nature Biotech., 18, 555 (2000) 等の記載に従って設計することができる。

(d) RNAi 法による本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞の作製

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、RNAi 法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA を上記 1 の (1) の (a) に記載の方法を用い、cDNA を調製する。

調製した cDNA の塩基配列を決定する。

決定した cDNA の配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする部分あるいは非翻訳領域の部分を含む適当な長さの RNAi 遺伝子を設計する。

該 RNAi 遺伝子を細胞内で発現させるために、調製した cDNA の断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞表面上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述 2 に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体への組み込みが可能で、設計した RNAi 遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述 2 に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述 2 に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、本項 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。



細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、本項1の(5)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述4または後述5に記載の方法があげられる。

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを調製する方法としては、例えば、本項1の(1)の(a)に記載されたcDNAの調製方法などがあげられる。

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の塩基配列に基づいて設計したRNAi遺伝子を、直接宿主細胞に導入することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を得ることができる。

RNAi遺伝子は、常法またはDNA合成機を用いることにより調製することができる。RNAi遺伝子のコンストラクトは、[Nature, 391, 806 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 15502 (1998); Nature, 395, 854 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 5049 (1999); Cell, 95, 1017 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 1451 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 13959 (1998); Nature Cell Biol., 2, 70 (2000)]等の記載に従って設計することができる。

(e) トランスポゾンを用いた方法による、本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞の作製

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、Nature Genet., 25, 35 (2000)等に記載のトランスポゾンのシステムを用い、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に突然変異体を選択することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を作製することができる。

トランスポゾンのシステムとは、外来遺伝子をランダムに染色体上に挿入させることで突然変異を誘発させるシステムであり、通常、トランスポゾンに挿まれた外来遺伝子に突然変

異を誘発させるベクターとして用い、この遺伝子を染色体上にランダムに挿入させるためのトランスポゼースの発現ベクターを同時に細胞の中に導入する。

トランスポゼースは、用いるトランスポゾンの配列に適したものであればいかなるものも用いることができる。

外来遺伝子としては、宿主細胞の DNA に変異を誘起するものであればいかなる遺伝子も用いることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述 2 に記載の宿主細胞があげられる。各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述 2 に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、本項 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、本項 1 の (5) に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、後述 4 または後述 5 に記載の方法があげられる。

## (2) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、該酵素のドミナントネガティブ体を導入する手法を用いることにより作製することができる。細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fx などがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。

これらの酵素は、基質特異性を有したある特定の反応を触媒する酵素であり、このような基質特異性を有した触媒作用を有する酵素の活性中心を破壊することで、これらの酵素のドミナントネガティブ体を作製することができる。標的とする酵素のうち、GMD を例として、そのドミナントネガティブ体に作製について具体的に以下に述べる。

大腸菌由来の GMD の立体構造を解析した結果、4つのアミノ酸（133 番目のトレオニン、135 番目のグルタミン酸、157 番目のチロシン、161 番目のリシン）が酵素活性に重要な機能を担っていることが明らかにされている（Structure, 8, 2, 2000）。すなわち、立体構造の情報にもとづきこれら4つのアミノ酸を異なる他のアミノ酸に置換した変異体を作製した結果、いずれの変異体においても有意に酵素活性が低下していたことが示されている。一方、GMD の補酵素 NADP や基質である GDP-マンノースとの結合能に関しては、いずれの変異体においてもほとんど変化が観察されていない。従って、GMD の酵素活性を担うこれら4つのアミノ酸を置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。大腸菌由来の GMD のドミナントネガティブ体の作製の結果に基づき、アミノ酸配列情報をもとにした相同性比較や立体構造予測を行うことにより、例えば、CHO 細胞由来の GMD（配列番号2）では、155 番目のトレオニン、157 番目のグルタミン酸、179 番目のチロシン、183 番目のリシンを他のアミノ酸に置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。このようなアミノ酸置換を導入した遺伝子の作製は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) 等に記載された部位特異的変異導入法を用いて行うことができる。

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、上述のように作製した標的酵素のドミナントネガティブ体をコードする遺伝子（以下、ドミナントネガティブ体遺伝子と略記する）を用い、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) 等に記載された遺伝子導入の方法に従って、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型

糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関する酵素のドミナントネガティブ体遺伝子を調製する。

調製したドミナントネガティブ体遺伝子の全長 DNA をもとにして、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。

該 DNA 断片、または全長 DNA を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、形質転換体を得る。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述 2 に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なまたは染色体中への組み込みが可能で、目的とするドミナントネガティブ体をコードする DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述 2 に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述 2 に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述 1 (1) の (a) に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述1の(5)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述4または後述5に記載の方法があげられる。

### (3) 酵素に突然変異を導入する手法

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子に突然変異を導入し、該酵素に突然変異を生じた所望の細胞株を選択する手法を用いることにより作製できる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fx などがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。

酵素に突然変異を導入する方法としては、1) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として所望の細胞株を選択する方法、2) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、生産抗体分子の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法、3) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、該細胞の細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法などがあげられる。

突然変異誘発処理としては、親株の細胞の DNA に点突然変異、欠失あるいはフレームシフト突然変異を誘起するものであればいかなる処理も用いることができる。

具体的には、エチルニトロソウレア、ニトロソグアニジン、ベンゾピレン、アクリジン色素による処理、放射線の照射などがあげられる。また、種々のアルキル化剤や発癌物質も突然変異誘発物質として用いることができる。突然変異誘発物質を細胞に作用させる方法としては、例えば、組織培養の技術第三版(朝倉書店) 日本組織培養学会編(1996)、Nature

Genet., 24, 314, (2000)等に記載の方法を挙げることができる。

自然発生的に生じた突然変異体としては、特別な突然変異誘発処理を施さないで、通常の細胞培養の条件で継代培養を続けることによって自然発生的に生じる突然変異体を挙げるることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を測定する方法としては、例えば、本項 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述 4 または後述 5 に記載の方法があげられる。細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、本項の 1 の (5) に記載の方法があげられる。

#### (4) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、アンチセンス RNA/DNA 技術 [バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)]、トリプル・ヘリックス技術 [Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)] 等を用い、標的とする遺伝子の転写または翻訳を抑制することで作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fx などがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を測定する方法としては、例えば、本項 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、本項 1 の (5) に記載

の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述 4 または後述 5 に記載の方法があげられる。

(5) N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法を用いることにより作製することができる。

N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法としては、例えば、Somatic Cell Mol. Genet., 12, 51 (1986)等に記載のレクチンを用いた方法があげられる。

レクチンとしては、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンであればいずれのレクチンでも用いることができるが、その具体的な例としては、レンズマメレクチン LCA (Lens Culinaris 由来の Lentil Agglutinin) エンドウマメレクチン PSA (Pisum sativum 由来の Pea Lectin) 、ソラマメレクチン VFA (Vicia faba 由来の Agglutinin) 、ヒイロチャワンタケレクチン AAL (Aleuria aurantia 由来の Lectin) 等を挙げることができる。

具体的には、 $1\mu\text{g/mL}$ ~ $1\text{mg/mL}$  の濃度の上述のレクチンを含む培地で 1 日~2 週間、好ましくは 1 日~1 週間培養し、生存している細胞を継代培養あるいはコロニーをピックアップし別の培養容器に移し、さらに引き続きレクチンを含む培地で培養を続けることによって、本発明の N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択することができる。

## 2. 抗体組成物の製造方法

本発明の抗体組成物は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press, 1993、Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996 等に記載された方法を用い、例えば、以下のように宿主細胞中で発

現させて取得することができる。

抗ヒトガングリオシド GM2 抗体分子の全長 cDNA を調製し、該抗体分子をコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。

該 DNA 断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、抗体組成物を生産する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、抗体を発現できるものであればいずれも用いることができる。

抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合糖鎖の修飾に係わる酵素、すなわち細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素が失活した細胞を選択するか、または前述 1 に示された種々の人為的手法により得られた細胞を宿主細胞として用いることもできる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、目的とする抗体分子をコードする DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

cDNA は、前記 1. の (1) の (a) に記載の cDNA の調製方法に従い、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞より、目的とする抗体分子をコードする cDNA に特異的なプローブまたはプライマー等を用いて調製することができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419) 等をあげることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PH05 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、gal 1 プロモーター、gal 10 プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF  $\alpha$  1 プロモーター、CUP 1 プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クリュイベロミセス属、



トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriology, 153, 163 (1983)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 75, 1929 (1978)] に記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平 3-22979 ; Cytotechnology, 3, 133, (1990)]、pAS3-3 [特開平 2-227075]、pCDM8 [Nature, 329, 840, (1987)]、pcDNA1/Amp (Invitrogen 社)、pREP4 (Invitrogen 社)、pAGE103 [J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、pAGE210 等をあげることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) の IE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40 の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター等をあげることができる。また、ヒト CMV の IE 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞である COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞、HBT5637 (特開昭 63-299)、ラットミエローマ細胞、マウスミエローマ細胞、シリアンハムスター腎臓由来細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 [特開平 2-227075]、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7413 (1987)]、インジェクション法 [Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 [特許第 2606856、特許第 2517813]、DEAE-デキス

トラン法 [バイオマニュアルシリーズ 4—遺伝子導入と発現・解析法 (羊土社) 横田崇・新井賢一編 (1994)]、ウイルスベクター法 [Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)]等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、発現ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともに Invitrogen 社) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスである *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda* の卵巣細胞である Sf9、Sf21 [カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、*Trichoplusia ni* の卵巣細胞である High 5 (Invitrogen 社) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記発現導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Ti プラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター、イネアクチン 1 プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルフ

アルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (Agrobacterium) [特開昭 59-140885、特開昭 60-70080、W094/00977]、エレクトロポレーション法 [特開昭 60-251887]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 [日本特許第 2606856、日本特許第 2517813] 等をあげることができる。

抗体組成物の発現方法としては、直接発現以外に、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載されている方法等に準じて、分泌生産、Fc 領域と他の蛋白質との融合蛋白質発現等を行うことができる。

糖鎖の合成に関与する遺伝子を導入した酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞により発現させた場合には、導入した遺伝子によって糖あるいは糖鎖が付加された抗体分子を得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に抗体分子を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、抗体組成物を製造することができる。形質転換体を培地に培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫

酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は 15～40℃がよく、培養時間は、通常 16 時間～7 日間である。培養中の pH は 3～9 に保持する。pH の調製は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lac プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド等を、trp プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている RPMI1640 培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、Eagle の MEM 培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変 MEM 培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199 培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73, 1 (1950)]、Whitten 培地[発生工学実験マニュアルトランスジェニック・マウスの作り方 (講談社) 勝木元也編 (1987)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常 pH6～8、30～40℃、5%CO<sub>2</sub> 存在下等の条件下で 1～7 日間行う。

また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM-FH 培地 (Pharmingen 社)、Sf-900 II SFM 培地 (Life Technologies 社)、ExCell400、ExCell405 (いずれも JRH Biosciences 社)、Grace's Insect Medium [Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

培養は、通常 pH6～7、25～30℃等の条件下で、1～5 日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スコーグ(MS)培地、ホワイト(White)培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常 pH5~9、20~40℃の条件下で 3~60 日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、抗体分子をコードする DNA を組み込んだ発現ベクターを保有する動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。

抗体組成物の発現方法としては、直接発現以外に、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載されている方法に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

抗体組成物の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させる抗体分子の構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

抗体組成物が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 8227 (1989); Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、または特開平 05-336963、W094/23021 等に記載の方法を準用することにより、該抗体組成物を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、発現ベクターに、抗体分子をコードする DNA、および抗体分子の発現に適切なシグナルペプチドをコードする DNA を挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入の後に抗体分子を発現させることにより、目的とする抗体分子を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平 2-227075 に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を

用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体（トランスジェニック非ヒト動物）または植物個体（トランスジェニック植物）を造成し、これらの個体を用いて抗体組成物を製造することもできる。

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、抗体組成物を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該抗体組成物を採取することにより、該抗体組成物を製造することができる。

動物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば公知の方法 [American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S (1996); American Journal of Clinical Nutrition), 63, 627S (1996); Bio/Technology, 9, 830 (1991)] に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に目的とする抗体組成物を生産させる方法があげられる。

動物個体の場合は、例えば、抗体分子をコードする DNA を導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、抗体組成物を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク（特開昭 63-309192）または卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである  $\alpha$  カゼインプロモーター、 $\beta$  カゼインプロモーター、 $\beta$  ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

植物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば抗体分子をコードする DNA を導入したトランスジェニック植物を公知の方法 [組織培養, 20 (1994); 組織培養, 21(1995); Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)] に準じて栽培し、抗体組成物を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を生産する方法があげられる。

抗体分子をコードする DNA を導入した形質転換体により製造された抗体組成物は、例えば抗体組成物が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分

離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロー  
ス、DIAION HPA-75 (三菱化学 (株) 製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー  
法、S-Sepharose

FF (Pharmacia 社) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファ  
ロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を  
用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等  
電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、抗体組成物の精製  
標品を得ることができる。

また、抗体組成物が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎  
し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として抗体組成物の不溶体を回収する。回収した  
抗体組成物の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することに  
より、該抗体組成物を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該抗体組  
成物の精製標品を得ることができる。

抗体組成物が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該抗体組成物あるいはその誘導体  
を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理する  
ことにより培養上清を取得し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることによ  
り、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

以下に、本発明の抗体組成物の取得のより具体的な例として、ヒト化抗体の組成物の製造  
方法について記すが、他の抗体組成物も当該方法と同様にして取得することができる。

#### (1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子が組み込ま  
れた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体の CH および CL を  
コードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

ヒト抗体の C 領域としては、任意のヒト抗体の CH および CL であることができ、例えば、  
ヒト抗体の H 鎖の IgG1 サブクラスの C 領域 (以下、hC $\gamma$ 1 と表記する) およびヒト抗体の L  
鎖の  $\kappa$  クラスの C 領域 (以下、hC $\kappa$  と表記する) 等があげられる。

ヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成る染色

体 DNA を用いることができ、また、mRNA から逆転写して作製された cDNA を用いることもできる。

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体の C 領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)]、pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78, 1527 (1981)]、pSG1  $\beta$  d2-4 [Cytotechnology, 4, 173 (1990)] 等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40 の初期プロモーターとエンハンサー [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスの LTR [Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)]、免疫グロブリン H 鎖のプロモーター [Cell, 41, 479 (1985)] とエンハンサー [Cell, 33, 717 (1983)] 等があげられる。

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体 H 鎖及び L 鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ（以下、タンデム型と表記する）のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体 H 鎖及び L 鎖の発現量のバランスが均衡する等の点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい [J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)]。タンデム型のヒト化抗体発現ベクターとしては、pKANTEX93 [Mol. Immunol., 37, 1035 (2000)]、pEE18 [Hybridoma, 17, 559 (1998)] などがあげられる。

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体及びヒト型 CDR 移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

## (2) ヒト以外の動物の抗体の V 領域をコードする cDNA の取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体の VH および VL をコードする cDNA は以下のようにして取得することができる。

ガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマ細胞から抽出した mRNA を鋳型として用い、cDNA を合成する。合成した cDNA をファージ或いはプラスミド等のベクターに挿入して cDNA ライブラリーを作製する。該ライブラリーより、既存のマウス抗体の C 領域或いは V 領域をコードする DNA をプローブとして用い、H 鎖 V 領域をコードする cDNA を有する組換えファージ或いは組換えプラスミド及び L 鎖 V 領域をコードする cDNA を



有する組換えファージ或いは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的のマウス抗体の VH および VL の全塩基配列を決定し、塩基配列より VH および VL の全アミノ酸配列を推定する。

ガングリオシド GM2 に特異的に結合できるヒト以外の動物の抗体を生産するハイブリドーマ細胞は、ガングリオシド GM2 をヒト以外の動物に免疫し、周知の方法 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, (1998)] に従って、免疫された動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞とでハイブリドーマを作製し、次いで単一細胞化したハイブリドーマを選択し、これを培養し、培養上清から精製し、取得することができる。

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ハイブリドーマ細胞から全 RNA を調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymol., 154, 3 (1987)]、また全 RNA から mRNA を調製する方法としては、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] 等があげられる。また、ハイブリドーマ細胞から mRNA を調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia 社製) 等があげられる。

cDNA の合成及び cDNA ライブラリー作製法としては、常法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34]、或いは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL 社製) や ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene 社製) を用いる方法などがあげられる。

cDNA ライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出した mRNA を鋳型として合成した cDNA を組み込むベクターは、該 cDNA を組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、 $\lambda$  ZAP II (Stratagene 社製)、 $\lambda$  gt10、 $\lambda$  gt11 [DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (Clontech

社製)、 $\lambda$  ExCell、pT7T3 18U (Pharmacia 社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)] 及び pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)] 等が用いられる。

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築される cDNA ライブラリーを導入する大腸菌としては該 cDNA ライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [Strategies, 5, 81 (1992)]、C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)] 及び JM105 [Gene, 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

cDNA ライブラリーからのヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA クローンを選択する方法としては、アイソトープ或いは蛍光などで標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはプラーク・ハイブリダイゼーション法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] により選択することができる。また、プライマーを調製し、cDNA 或いは cDNA ライブラリーを鋳型として、PCR [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34] により VH および VL をコードする cDNA を調製することもできる。

上記方法により選択された cDNA を、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、ABI PRISM377 DNA シークエンサー (Applied Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより該 cDNA の塩基配列を決定することができる。

決定した塩基配列から VH および VL の全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体の VH および VL の全アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより、取得した cDNA が分泌シグナル配列を含む抗体の VH および VL を完全に含んでいるアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

さらに、抗体可変領域のアミノ酸配列または該可変領域をコードする DNA の塩基配列がす

で公知である場合には、以下の方法を用いて製造することができる。

アミノ酸配列が公知である場合には、コドンの使用頻度 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991] を考慮して該可変領域をコードする DNA 配列を設計し、設計した DNA 配列に基づき、100 塩基前後の長さからなる数本の合成 DNA を合成し、それらを用いて PCR 法を行うことにより DNA を得ることができる。塩基配列が公知である場合には、その情報を基に 100 塩基前後の長さからなる数本の合成 DNA を合成し、それらを用いて PCR 法を行うことにより DNA を得ることができる。

### (3) ヒト以外の動物の抗体の V 領域のアミノ酸配列の解析

分泌シグナル配列を含む抗体の VH および VL の完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体の VH および VL のアミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより、分泌シグナル配列の長さ及び N 末端アミノ酸配列を推定でき、更には抗体が属するサブグループを知ることができる。また、VH および VL の各 CDR のアミノ酸配列についても、同様の方法で見出すことができる。

### (4) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

本項 2 の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA を挿入し、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA を、ヒト以外の動物の抗体 VH および VL の 3' 末端側の塩基配列とヒト抗体の CH および CL の 5' 末端側の塩基配列とからなり、かつ適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成 DNA とそれぞれ連結し、それぞれを本項 2 の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するように挿入し、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

### (5) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域をコードする cDNA の構築

ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA は、以下のようにして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR を移植するヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank 等のデータベースに登録されているヒト抗体の VH および VL の FR のアミ

ノ酸配列、ヒト抗体の VH および VL の FR の各サブグループの共通アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991] 等があげられるが、その中でも、十分な活性を有するヒト型 CDR 移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列とできるだけ高い相同性 (少なくとも 60%以上) を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。

次に、選択したヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列を移植し、ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991] を考慮して DNA 配列に変換し、ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列をコードする DNA 配列を設計する。設計した DNA 配列に基づき、100 塩基前後の長さからなる数本の合成 DNA を合成し、それらを用いて PCR 法を行う。この場合、PCR での反応効率及び合成可能な DNA の長さから、H 鎖、L 鎖とも 4~6 本の合成 DNA を設計することが好ましい。

また、両端に位置する合成 DNA の 5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項 2 の (1) で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR 後、増幅産物を pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) 等のプラスミドにクローニングし、本項 2 の (2) に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列をコードする DNA 配列を有するプラスミドを取得する。

#### (6) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のみをヒト抗体の VH および VL の FR に移植しただけでは、その抗原結合活性は元のヒト以外の動物の抗体に比べて低下してしまうことが知られている [BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991)]。この原因としては、元のヒト以外の動物の抗体の VH および VL では、CDR のみならず、FR のいくつかのアミノ酸残基が直接的或いは間接的に抗原結合活性に関与しており、それらアミノ酸残基が CDR の移植に伴い、ヒト抗体の VH および VL の FR の異なるアミノ酸残基へと変化してしまうことが考えられている。この問題を解決するため、ヒト型 CDR 移植抗体では、ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基や CDR の

アミノ酸残基と相互作用したり、抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらを元のヒト以外の動物の抗体に由来するアミノ酸残基に改変し、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている [BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991)]。

ヒト型 CDR 移植抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わる FR のアミノ酸残基を如何に効率よく同定するかが、最も重要な点であり、そのために X 線結晶解析 [J. Mol. Biol., 112, 535 (1977)] 或いはコンピューターモデリング [Protein Engineering, 7, 1501 (1994)] 等による抗体の立体構造の構築及び解析が行われている。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト型 CDR 移植抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来たが、その一方、あらゆる抗体に適応可能なヒト型 CDR 移植抗体の作製法は未だ確立されておらず、現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討する等の種々の試行錯誤が必要である。

ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸残基の改変は、改変用合成 DNA を用いて本項 2 の (5) に記載の PCR 法を行うことにより、達成できる。PCR 後の増幅産物について本項 2 の (2) に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

#### (7) ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターの構築

本項 2 の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流に、本項 2 の (5) および (6) で構築したヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA を挿入し、ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築することができる。

例えば、本項 2 の (5) および (6) でヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL を構築する際に用いる合成 DNA のうち、両端に位置する合成 DNA の 5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項 2 の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するように挿入し、ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築することができる。

#### (8) ヒト化抗体の安定的生産

本項 2 の (4) 及び (7) に記載のヒト化抗体発現ベクターを適当な動物細胞に導入することによりヒト型キメラ抗体及びヒト型 CDR 移植抗体 (以下、併せてヒト化抗体と称す) を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

動物細胞へのヒト化抗体発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法〔特開平 2-257891; Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する動物細胞としては、ヒト化抗体を生産させることができる動物細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。

具体的には、マウスミエローマ細胞である NS0 細胞、SP2/0 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO/dhfr-細胞、CHO/DG44 細胞、ラットミエローマ細胞 YB2/0 細胞、IR983F 細胞、シリアンハムスター腎臓由来である BHK 細胞、ヒトミエローマ細胞であるナマルバ細胞などがあげられるが、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣細胞である CHO/DG44 細胞、ラットミエローマ YB2/0 細胞等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、G418 硫酸塩（以下、G418 と表記する；SIGMA 社製）等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640 培地（日水製薬社製）、GIT 培地（日本製薬社製）、EX-CELL302 培地（JRH 社製）、IMDM 培地（GIBCO BRL 社製）、Hybridoma-SFM 培地（GIBCO BRL 社製）、またはこれら培地に牛胎児血清（以下、FCS と表記する）等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の生産量及び抗原結合活性は酵素免疫抗体法〔以下、ELISA 法と表記する；Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1998、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996〕等により測定できる。また、形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、DHFR 遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A カラムを用いて精製することができる〔Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996〕。また、その他に通常、蛋白質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体の H 鎖、L 鎖或いは抗体分子全体の分子量は、SDS 変性ポリアク

リルアミドゲル電気泳動 [以下、SDS-PAGE と表記する ; Nature, 227, 680 (1970)] やウェスタンブロッティング法 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12, 1988、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996] 等で測定することができる。

以上、動物細胞を宿主とした抗体組成物の製造方法を示したが、上述したように、酵母、昆虫細胞、植物細胞または動物個体あるいは植物個体においても動物細胞と同様の方法により抗体組成物を製造することができる。

すでに宿主細胞が抗体を発現する能力を有する場合には、上記 1 に記載した方法を用いて抗体組成物を発現させる細胞を調製した後に、該細胞を培養し、該培養物から目的とする抗体組成物を精製することにより、本発明の抗体組成物を製造することができる。

### 3. 抗体組成物の活性評価

精製した抗体組成物の蛋白質量、抗原との結合活性あるいは細胞傷害活性を測定する方法としては、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996、あるいは Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996 等に記載の公知の方法を用いることができる。

その具体的な例としては、抗体組成物がヒト化抗体の場合、抗原との結合活性、抗原陽性培養細胞株に対する結合活性は ELISA 法及び蛍光抗体法 [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)] 等により測定できる。抗原陽性培養細胞株に対する細胞傷害活性は、CDC 活性、ADCC 活性等を測定することにより、評価することができる。[Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)]。

また、抗体組成物のヒトでの安全性、治療効果は、カニクイザル等のヒトに比較的近い動物種の適当なモデルを用いて評価することができる。

### 4. 抗体組成物の糖鎖の分析

各種細胞で発現させた抗体組成物の糖鎖構造は、通常の糖蛋白質組成物の糖鎖構造の解析に準じて行うことができる。例えば、IgG 分子に結合している糖鎖はガラクトース、マンノース、フコースなどの中性糖、N-アセチルグルコサミンなどのアミノ糖、シアル酸などの酸性糖から構成されており、糖組成分析および二次元糖鎖マップ法などを用いた糖鎖構造解析等の手法を用いて行うことができる。

### (1) 中性糖・アミノ糖組成分析

抗体組成物の糖鎖の組成分析は、トリフルオロ酢酸等で、糖鎖の酸加水分解を行うことにより、中性糖またはアミノ糖を遊離し、その組成比を分析することができる。

具体的な方法として、Dionex 社製糖組成分析装置を用いる方法があげられる。BioLC は HPAEC-PAD ( high performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection) 法 [J. Liq. Chromatogr., 6, 1577 (1983)] によって糖組成を分析する装置である。

また、2-アミノピリジンによる蛍光標識化法でも組成比を分析することができる。具体的には、公知の方法 [Agric. Biol. Chem., 55(1), 283 (1991)] に従って酸加水分解した試料を 2-アミノピリジル化で蛍光ラベル化し、HPLC 分析して組成比を算出することができる。

### (2) 糖鎖構造解析

抗体組成物の糖鎖の構造解析は、2 次元糖鎖マップ法 [Anal. Biochem., 171, 73 (1988)、生物化学実験法 23-糖蛋白質糖鎖研究法 (学会出版センター) 高橋禮子編 (1989 年)] により行うことができる。2 次元糖鎖マップ法は、例えば、X 軸には逆相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、Y 軸には順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、それぞれプロットし、既知糖鎖のそれらの結果と比較することにより、糖鎖構造を推定する方法である。

具体的には、抗体組成物をヒドラジン分解して、抗体組成物から糖鎖を遊離し、2-アミノピリジン (以下、PA と略記する) による糖鎖の蛍光標識 [J. Biochem., 95, 197 (1984)] を行った後、ゲルろ過により糖鎖を過剰の PA 化試薬などと分離し、逆相クロマトグラフィーを行う。次いで、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果をもとに、2 次元糖鎖マップ上にプロットし、糖鎖スタンダード (TaKaRa 社製)、文献 [Anal. Biochem., 171, 73 (1988)] とのスポットの比較より糖鎖構造を推定することができる。

さらに各糖鎖の MALDI-TOF-MS などの質量分析を行い、2 次元糖鎖マップ法により推定される構造を確認することができる。

## 5. 抗体分子の糖鎖構造を識別する免疫学的定量方法

抗体組成物は、抗体の Fc 領域に結合する糖鎖構造が異なった抗体分子から構成されている。



本発明の抗体組成物は、Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 100%であり、高い ADCC 活性を示す。このような抗体組成物は、上記 4. に記載の抗体組成物の糖鎖構造の分析法を用いることにより識別できる。また、レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いることによっても識別できる。

レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いた抗体組成物の糖鎖構造の識別は、文献 [Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc., (1995); 酵素免疫測定法, 第 3 版, 医学書院 (1987); 改訂版, 酵素抗体法, 学際企画 (1985)] 等に記載のウエスタン染色、RIA (Radioimmunoassay)、VIA (Viroimmunoassay)、EIA (Enzymoimmunoassay)、FIA (Fluoroimmunoassay)、MIA (Metalloimmunoassay) などの免疫学的定量方法に準じて、例えば、以下のように行うことができる。

抗体組成物を構成する抗体分子の糖鎖構造を認識するレクチンを標識し、標識したレクチンと試料である抗体組成物を反応させる。次に、標識したレクチンと抗体分子の複合体の量を測定する。

抗体分子の糖鎖構造を識別に用いられるレクチンとしては、例えば、WGA (T. vulgaris 由来の wheat-germ agglutinin)、ConA (C. ensiformis 由来の concanavalin A)、RIC (R. communis 由来の毒素)、L-PHA (P. vulgaris 由来の leukoagglutinin)、LCA (L. culinaris 由来の lentil agglutinin)、PSA (P. sativum 由来の Pea lectin)、AAL (Aleuria aurantia Lectin)、ACL (Amaranthus-caudatus Lectin)、BPL (Bauhinia purpurea Lectin)、DSL (Datura stramonium Lectin)、DBA (Dolichos biflorus Agglutinin)、EBL (Elderberry Balk Lectin)、ECL (Erythrina cristagalli Lectin)、EEL (Euonymus europaeus Lectin)、GNL (Galanthus nivalis Lectin)、GSL (Griffonia simplicifolia Lectin)、HPA (Helix pomatia Agglutinin)、HHL (Hippeastrum Hybrid Lectin)、Jacalin、LTL (Lotus tetragonolobus Lectin)、LEL (Lycopersicon esculentum Lectin)、MAL (Maackia amurensis Lectin)、MPL (Maclura pomifera Lectin)、NPL (Narcissus pseudonarcissus Lectin)、PNA (Peanut Agglutinin)、E-PHA (Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin)、PTL (Psophocarpus tetragonolobus Lectin)、RCA (Ricinus communis Agglutinin)、STL (Solanum tuberosum Lectin)、SJA (Sophora japonica Agglutinin)、SBA (Soybean Agglutinin)、UEA (Ulex europaeus Agglutinin)、VVL

(Vicia villosa Lectin)、WFA (Wisteria floribunda Agglutinin)があげられる。

N-グルコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合している糖鎖構造を特異的に認識するレクチンを用いることが好ましく、その具体的な例としては、レンズマメレクチン LCA (Lens Culinaris 由来の Lentil Agglutinin) エンドウマメレクチン PSA (Pisum sativum 由来の Pea Lectin) 、ソラマメレクチン VFA (Vicia faba 由来の Agglutinin) 、ヒイロチャワンタケレクチン AAL (Aleuria aurantia 由来の Lectin) を挙げることができる。

## 6. 本発明の抗体組成物の利用

本発明の抗体組成物はガングリオシド GM2 に特異的に結合し、高い ADCC 活性および CDC 活性を有するため、癌をはじめとする各種ガングリオシド GM2 発現細胞関連疾患の予防および治療において有用である。

本発明において、ガングリオシド GM2 関連疾患としては、ガングリオシド GM2 を発現する細胞が関与する疾患であればいかなるものも包含される。例えば、癌などがあげられる。

本発明の癌としては、神経外胚葉系腫瘍である神経芽細胞腫、胚小細胞癌およびメラノーマなどが包含される。

ガングリオシド GM2 は、正常細胞にはごく微量にしか存在しないが、肺小細胞癌、メラノーマ、神経芽細胞腫などの癌細胞では多量に存在し、GM2 に対するモノクローナル抗体は、これらの癌の治療に有用であると考えられている [Lancet, 48, 6154 (1988)]。通常の抗癌剤は、これらの癌細胞の増殖を抑制することを特徴とする。しかし、ADCC 活性または CDC 活性を有する抗体は、癌細胞に細胞死を誘導することができるため、通常の抗癌剤よりも治療薬として有効である。特に癌の治療薬において、現状では抗体医薬単独の抗腫瘍効果は不十分であり、化学療法との併用療法が行われているが [Science, 280, 1197 (1998)]、本発明の抗体組成物は単独で高い抗癌効果を有するため、化学療法に対する依存度が低くなり、副作用の低減にもなる。

本発明の抗体組成物は、ガングリオシド GM2 に特異的に結合し、ガングリオシド GM2 発現細胞に対して強い細胞傷害活性を示すので、ガングリオシド GM2 が発現した細胞を選択的に排除することができる。

また、本発明の抗体組成物は高い細胞傷害活性を有するため、従来の抗体組成物では治癒することができない、上述の癌などの患者を治療することができる。さらに、癌の場合、癌細胞の浸潤部位に薬物が届きにくいいため、少量の薬物でも治療効果を有することが好ましい。本発明の抗体組成物は少量でも高い ADCC 活性を有するため、上述の疾患の治療に有用である。

本発明の抗体組成物を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。または、抗体組成物を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を調製することもできる。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該抗体組成物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体組成物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体組成物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、有効成分の量として、通常成人1日当たり  $10 \mu\text{g/kg}$  ~  $20\text{mg/kg}$  である。

また、抗体組成物の各種腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討する方法は、インビトロ実験としては、CDC 活性測定法、ADCC 活性測定法等があげられ、インビボ実験としては、マウス等の実験動物での腫瘍系を用いた抗腫瘍実験等があげられる。

CDC 活性、ADCC 活性、抗腫瘍実験は、文献 [Cancer Immunology Immunotherapy, 36, 373 (1993)、CancerResearch, 54, 1511 (1994)] 等記載の方法に従って行うことができる。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、プラスミド pKOFUT8Neo の構築を示した図である。

第2図は、CHO/DG44 細胞の FUT8 対立遺伝子を1コピー破壊したヘミノックアウトクローンのゲノムサザンの解析結果を示した図である。レーンは左からそれぞれ分子量マーカー、ヘミノックアウトクローン 50-10-104 および親株である CHO/DG44 細胞のゲノムサザンである。

第3図は、CHO/DG44 細胞の FUT8 両対立遺伝子を破壊したダブルノックアウトクローン WK704 のゲノムサザン解析結果を示した図である。矢印は、相同組換えが起こった際に検出される陽性断片の検出位置を示す。

第4図は、CHO/DG44 細胞の FUT8 両対立遺伝子を破壊したダブルノックアウトクローンより薬剤耐性遺伝子を除去したクローンのゲノムサザン解析結果を示した図である。レーンは左からそれぞれ分子量マーカー、ダブルノックアウトクローンの薬剤耐性遺伝子除去クローン 4-5-C3、ダブルノックアウトクローン WK704、ヘミノックアウトクローン 50-10-104 および親株である CHO/DG44 細胞のゲノムサザンである。

第5図は、精製した Ms705/ GM2 抗体および DG44/ GM2 抗体のガングリオシド GM2 に対する ELISA 法における反応性を、抗体濃度を変化させて測定した図である。横軸に抗体濃度を、縦軸に各抗体濃度における吸光度を示す。□が DG44/ GM2 抗体、■が Ms705/ GM2 抗体をそれぞれ示す。

第6図は、精製した Ms705/ GM2 抗体および DG44/ GM2 抗体のヒト小細胞性肺癌株 SBC-3 細胞に対する ADCC 活性を、抗体濃度を変化させて測定した図である。横軸に抗体濃度を、縦軸に各抗体濃度における細胞傷害活性を示す。●が DG44/ GM2 抗体、○が Ms705/ GM2 抗体をそれぞれ示す。

以下に、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

## 実施例

### 実施例 1

ゲノム上の  $\alpha 1, 6$ -フコシルトランスフェラーゼ（以下、FUT8 と表記する）両対立遺伝子を破壊した CHO/DG44 細胞の造成

FUT8 両対立遺伝子の翻訳開始コドンを含むゲノム領域を欠失させた CHO/DG44 細胞株を以下の手順で造成した。

#### 1. チャイニーズハムスターFUT8 遺伝子のエクソン 2 を含むターゲティングベクター

##### pKOFUT8Neo の構築

W002/31140 の実施例 13 の 1 項に記載の方法で構築されたチャイニーズハムスターFUT8 遺伝子のエクソン 2 を含むターゲティングベクターpKOFUT8Puro および pK0SelectNeo (Lexicon 社製)を用いて、以下の様にして pKOFUT8Neo を構築した。

pK0SelectNeo (Lexicon 社製)を制限酵素 AscI (New England Biolabs 社製)で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BI0101 社製)を用いてネオマイシン耐性遺伝子発現ユニットを含む約 1.6Kb の AscI 断片を回収した。

次に、pKOFUT8Puro を制限酵素 AscI (New England Biolabs 社製)で消化後、大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製)により、DNA 断片の末端を脱リン酸化させた。反応

後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿法を用いて、DNA断片を精製した。

上記で得た pK0SelectNeo 由来の AscI 断片 (約 1.6Kb) 0.1  $\mu$ g と pKOFUT8Puro 由来の AscI 断片 (約 10.1Kb) 0.1  $\mu$ g に滅菌水を加えて 5  $\mu$ L とし、Ligation High (東洋紡社製) 5  $\mu$ L を加えて 16°C で 30 分間反応させることにより、連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより各々プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサ ABI PRISM 377 により塩基配列を解析した。この様にして第 1 図に示した pKOFUT8Neo を得た。pKOFUT8Neo は CHO 細胞の FUT8 遺伝子ヘミノックアウト細胞株を作製するためのターゲティングベクターとして用いた。

## 2. ゲノム上の FUT8 遺伝子の 1 コピーを破壊したヘミノックアウト細胞株の作製

### (1) ターゲティングベクター pKOFUT8Neo 導入株の取得

ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (dhfr) を欠損したチャイニーズハムスター卵巣由来 CHO/DG44 細胞 [Somatic Cell and Molecular Genetics, 12, 555, 1986] に、実施例 1 の 1 項で構築したチャイニーズハムスター FUT8 ゲノム領域ターゲティングベクター pKOFUT8Neo を以下の様にして導入した。

pKOFUT8Neo を制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製) で消化して線状化し、線状化した 4  $\mu$ g の pKOFUT8Neo を  $1.6 \times 10^6$  個の CHO/DG44 細胞へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入した後、IMDM-dFBS (10)-HT (1) [透析 FBS (インビトロジェン社製) を 10%、HT supplement (インビトロジェン社製) を 1 倍濃度で含む IMDM 培地 (インビトロジェン社製)] に懸濁し、接着細胞培養用 10cm デッシュ (Falcon 社製) へ播種した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、24 時間培養後、G418 (ナカライテスク社製) を 600  $\mu$ g/mL の濃度で含む IMDM-dFBS (10) [透析 FBS を 10% で含む IMDM 培地] 10mL に培地交換した。この培地交換作業を 3~4 日毎に繰り返しながら 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、15 日間の培養を行い、G418 耐性クローンを取得した。

### (2) ゲノム PCR による相同組換えの診断

本項(1)で取得した G418 耐性クローンの相同組換えの診断を、ゲノム DNA を用いた PCR により、以下の様に行った。

96 穴プレート上の G418 耐性クローンに対してトリプシン処理を行った後、2 倍容量の凍結培地 [20% DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM] を各ウェルに添加、懸濁した。各ウェル中の細胞懸濁液の半量を接着細胞用平底 96 穴プレート（旭テクノグラス社製）へ播種してレプリカプレートとする一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存した。

レプリカプレート上のネオマイシン耐性クローンは、G418 を  $600 \mu\text{g/mL}$  の濃度で含む IMDM-dFBS (10) で 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、1 週間培養した後、細胞を回収し、回収した細胞から公知の方法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 201, 331 (1992)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々  $30 \mu\text{L}$  の TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) [10mmol/L Tris-HCl、1mmol/L EDTA、 $200 \mu\text{g/mL}$  RNase A] に一晩溶解した。

ゲノム PCR に用いるプライマーは以下の様に設計した。まず、W003/31140 の実施例 12 に記載の方法により取得した FUT8 ゲノム領域の配列 (配列番号 13) の中から、配列番号 39 または配列番号 40 でそれぞれ示されるプライマーをフォワードプライマーとした。また、ターゲティングベクターの loxP 配列に特異的に結合するプライマー (配列番号 41 または配列番号 42) をリバースプライマーとし、以下のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に用いた。上記で調製したゲノム DNA 溶液を各々  $10 \mu\text{L}$  含む  $25 \mu\text{L}$  の反応液 [DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製)、ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、 $0.5 \mu\text{mol/L}$  上記プライマー (フォワードプライマーとリバースプライマーを組み合わせる) ] を調製し、94°C で 3 分間の加熱の後、94°C で 1 分間、60°C で 1 分間、72°C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとした条件で PCR を行った。

PCR 後、該反応液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、相同組換えによって生じる約 1.7Kb の特異的増幅産物が認められた株を陽性クローンと判定した。

### (3) ゲノムサザンプロットによる相同組換えの診断

本項(2)で取得された陽性クローンの相同組換えの診断を、ゲノム DNA を用いたサザンプロットにより、以下の様に行った。

本項(2)で凍結保存したマスタープレートのうち、本項(2)で見出された陽性クローンを含む 96 穴プレートを選択し、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、10 分間静置した後、陽性クローンに該当するウェル中の細胞を接着細胞用平底 24 穴プレート（グライナー社製）へ播種し

た。G418 を 600  $\mu$ g/mL の濃度で含む IMDM-dFBS(10)を用いて 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、1 週間培養した後、接着細胞用平底 6 穴プレート（グライナー社製）へ播種した。該プレートを 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C にて培養し、細胞を回収した。回収した細胞より公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 3, 2303, (1976)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々 150  $\mu$ L の TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) に一晚溶解した。

上記で調製したゲノム DNA 12  $\mu$ g を制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製) で消化し、エタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、20  $\mu$ L の TE 緩衝液 (pH8.0) [10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA] に溶解し、0.6%(w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 3683, (1979)] に従って、ナイロン膜へゲノム DNA を転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し 80°C で 2 時間の熱処理を行い、固定化した。

一方、サザンブロットに用いるプローブを以下のように調製した。W003/31140 の実施例 12 に記載の方法により取得した FUT8 ゲノム領域の配列 (配列番号 13) の中から、配列番号 43 および配列番号 44 でそれぞれ示されるプライマーを作製し、以下の PCR に用いた。

W002/31140 の実施例 12 に記載の pFUT8fgE2-2 4.0ng をテンプレートとして含む 20  $\mu$ L の反応液 [DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製)、ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5  $\mu$ mol/L 上記プライマー] を調製し、94°C で 1 分間の加熱の後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、74°C で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で PCR を行った。

PCR 後、該反応液を 1.75%(w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BIO101 社製) を用いて約 230bp のプローブ DNA 断片を回収した。得られたプローブ DNA 溶液のうち 5  $\mu$ L を、[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下の様に行った。まず、上記のゲノム DNA 消化物が転写されたナイロン膜をローラーボトルへ封入し、15mL のハイブリダイゼーション液 [5×SSPE、50×Denhardt's 液、0.5%(w/v) SDS、100  $\mu$ g/mL サケ精子 DNA] を加えて 65°C で 3 時間のプレハイブリダイゼーションを行った後、<sup>32</sup>P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65°C で一晚ハイブリダイゼーションを行った。



ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 50mL の一次洗浄液 [ $2\times\text{SSC}-0.1\%(\text{w/v})$  SDS] に浸漬し、65℃で 15 分間加温して洗浄した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、ナイロン膜を 50mL の二次洗浄液 [ $0.2\times\text{SSC}-0.1\%(\text{w/v})$  SDS] に浸漬し、65℃で 15 分間加温して洗浄した。洗浄後、ナイロン膜を X 線フィルムへ -80℃で暴露し現像した。

第 2 図には、親株である CHO/DG44 細胞、および本項 (2) で取得した陽性クローンである 50-10-104 株のゲノム DNA を本法により解析した結果を示した。CHO/DG44 細胞では、野生型 FUT8 対立遺伝子由来の約 25.5Kb の断片のみが検出された。一方、陽性クローン 50-10-104 株では、野生型 FUT8 対立遺伝子由来の約 25.5Kb の断片に加え、相同組換えされた対立遺伝子に特異的な約 20.0Kb の断片が検出された。両断片の量比は 1 : 1 であったことから、50-10-104 株は、FUT8 対立遺伝子のうち 1 コピーが破壊されたヘミノックアウトクローンであることが確認された。

### 3. ゲノム上の FUT8 遺伝子をダブルノックアウトした CHO/DG44 細胞の作製

#### (1) ターゲティングベクター pKOFUT8Puro 導入株の作製

本実施例の 2 項で得た FUT8 遺伝子ヘミノックアウトクローンのもう一方の FUT8 対立遺伝子を破壊するために、W002/31140 の実施例 13 の 1 項に記載のチャイニーズハムスター FUT8 遺伝子エクソン 2 ターゲティングベクターである pKOFUT8Puro を以下の様にして導入した。

pKOFUT8Puro を制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製) で消化して線状化し、線状化した 4  $\mu$ g の pKOFUT8Puro を  $1.6\times 10^6$  個の FUT8 遺伝子ヘミノックアウトクローンへエレクトロポレーション法[サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]により導入後、IMDM-dFBS (10)-HT(1) に懸濁し、接着細胞培養用 10cm デッシュ (Falcon 社製) へ播種した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃、24 時間培養後、ピューロマイシン (SIGMA 社製) を 15  $\mu$ g/mL の濃度で含む IMDM-dFBS (10)-HT(1) 10mL に培地交換した。この培地交換作業を 7 日毎に繰り返しながら 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃、15 日間の培養を行い、ピューロマイシン耐性クローンを取得した。

#### (2) ゲノムサザンプロットによる相同組換えの診断

本項 (1) で取得された薬剤耐性クローンの相同組換えの診断を、ゲノム DNA を用いたサザンプロットにより以下の様に行った。

ピューロマイシン耐性クローンを、公知の方法 [Gene Targeting, Oxford University Press, (1993)] に従って接着細胞用平底プレート (旭テクノグラス社製) へ採取し、ピューロマイシン (SIGMA 社製) を  $15\mu\text{g/mL}$  の濃度で含む IMDM-dFBS (10)-HT(1) を用いて  $5\%\text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^\circ\text{C}$ 、1 週間培養した。

培養後、上記プレートの各クローンに対しトリプシン処理を行い、接着細胞用平底 24 穴プレート (グライナー社製) へ播種した。ピューロマイシン (SIGMA 社製) を  $15\mu\text{g/mL}$  の濃度で含む IMDM-dFBS (10)-HT(1) を用いて  $5\%\text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^\circ\text{C}$ 、1 週間培養した後、同様にトリプシン処理を行い、接着細胞用平底 6 穴プレート (グライナー社製) へ播種した。該プレートを  $5\%\text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^\circ\text{C}$  にて培養し、回収した細胞より公知の方法 [ヌクレック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 3, 2303, (1976)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々  $150\mu\text{L}$  の TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) に一晩溶解した。

上記で調製したゲノム DNA  $12\mu\text{g}$  を制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製) で消化し、エタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、 $20\mu\text{L}$  の TE 緩衝液 (pH8.0) に溶解し、 $0.6\%(\text{w/v})$  アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 3683, (1979)] に従って、ナイロン膜へゲノム DNA を転写した。転写後、ナイロン膜に対し  $80^\circ\text{C}$  で 2 時間の熱処理を行い、固定化した。

一方、サザンブロットに用いるプローブを以下のように調製した。まず、ターゲティングベクターに含まれる FUT8 ゲノム領域よりもさらに 5' 側の配列に特異的に結合するプライマー (配列番号 45 および配列番号 46) を作製し、以下の PCR に用いた。W002/31140 の実施例 12 に記載のプラスミド pFUT8fgE2-2  $4.0\text{ng}$  をテンプレートとして含む  $20\mu\text{L}$  の反応液 [DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製)、ExTaq buffer (宝酒造社製)、 $0.2\text{mmol/L}$  dNTPs、 $0.5\mu\text{mol/L}$  上記プライマー] を調製し、 $94^\circ\text{C}$  で 1 分間の加熱の後、 $94^\circ\text{C}$  で 30 秒間、 $55^\circ\text{C}$  で 30 秒間、 $74^\circ\text{C}$  で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で PCR を行った。

PCR 後、該反応液を  $1.75\%(\text{w/v})$  アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BI0101 社製) を用いて約  $230\text{bp}$  のプローブ DNA 断片を精製した。得られたプローブ DNA 溶液のうち  $5\mu\text{L}$  を、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP  $1.75\text{MBq}$  および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下の様に行った。まず、上記のゲノム DNA 消化物が転写されたナイロン膜をローラーボトルへ封入し、15mL のハイブリダイゼーション液 [5×SSPE、50×Denhardt's 液、0.5%(w/v) SDS、100 μg/mL サケ精子 DNA] を加えて 65℃で 3 時間のプレハイブリダイゼーションを行った後、<sup>32</sup>P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 50mL の一次洗浄液 [2×SSC-0.1%(w/v) SDS] に浸漬し、65℃で 15 分間加温して洗浄した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、ナイロン膜を 50mL の二次洗浄液 [0.2×SSC-0.1%(w/v) SDS] に浸漬し、65℃で 15 分間加温して洗浄した。洗浄後、ナイロン膜を X 線フィルムへ-80℃で暴露し現像した。

第 3 図には、50-10-104 株から本項(1)に記載の方法により取得したピューロマイシン耐性クローンの 1 つである WK704 株のゲノム DNA を本法により解析した結果を示した。WK704 株では、野生型 FUT8 対立遺伝子由来の約 25.5Kb の断片が消失し、相同組換えされた対立遺伝子に特異的な約 20.0Kb の断片 (図中に矢印で示す) のみが検出された。この結果から WK704 株は、FUT8 両対立遺伝子が破壊されたクローンであることが確認された。

#### 4. FUT8 遺伝子をダブルノックアウトした細胞からの薬剤耐性遺伝子の除去

##### (1) Cre リコンビナーゼ発現ベクターの導入

本実施例の 3 項で取得した FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローンの薬剤耐性遺伝子を除去することを目的として、Cre リコンビナーゼ発現ベクター pBS185 (Life Technologies 社製) を以下の様にして導入した。

4 μg の pBS185 を  $1.6 \times 10^6$  個の FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローンへエレクトロポレーション法[サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]により導入後、IMDM-dFBS (10)-HT(1) 10mL に懸濁し、さらに同培地を用いて 2 万倍に希釈した。該希釈液を接着細胞培養用 10cm ディッシュ (Falcon 社製) 7 枚へ播種後、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃、10 日間の培養を行い、コロニーを形成させた。

##### 5. Cre リコンビナーゼ発現ベクター導入株の取得

本項(1)で取得したコロニーのうち、任意のクローンを公知の方法 [Gene Targeting, Oxford University Press, (1993)] に従って接着細胞用平底プレート (旭テクノグラス社

製)へ採取し、IMDM-dFBS(10)-HT(1)を用いて5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃、1週間培養した。

培養後、上記プレートの各クローンに対してトリプシン処理を行い、2倍容量の凍結培地[20% DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM]を各ウェルに添加、懸濁した。各ウェル中の細胞懸濁液の半量を接着細胞用平底96穴プレート(旭テクノガラス社製)へ播種してレプリカプレートとする一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存した。

次にレプリカプレート上の細胞を、G418を600μg/mL、ピューロマイシンを15μg/mLの濃度で含むIMDM-dFBS(10)-HT(1)を用いて5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃、一週間培養した。Creリコンビナーゼの発現によりloxP配列に挟まれた薬剤耐性遺伝子が除去された陽性クローンは、G418およびピューロマイシン存在下で死滅する。本法により陽性クローンを選択した。

### (3) ゲノムサザンプロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断

本項(2)で選択した陽性クローンに対し、以下の手順でゲノムサザンプロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断を行った。

本項(2)で凍結保存したマスタープレートのうち、上記陽性クローンを含む96穴プレートを選択し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃、10分間静置した。静置後、上記クローンに該当するウェルから細胞を接着細胞用平底24穴プレート(グライナー社製)へ播種した。

IMDM-dFBS(10)-HT(1)を用いて1週間培養した後、トリプシン処理を行い、接着細胞用平底6穴プレート(グライナー社製)へ播種して5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃で培養し、増殖した細胞を回収した。回収した細胞より公知の方法[ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research), 3, 2303, (1976)]に従って各クローンのゲノムDNAを調製し、各々150μLのTE-RNase緩衝液(pH8.0)に一晩溶解した。

上記で調製したゲノムDNA 12μgを制限酵素NheI(New England Biolabs社製)で消化し、エタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、20μLのTE緩衝液(pH8.0)に溶解し、0.6%(w/v)アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 3683, (1979)]に従って、ナイロン膜へゲノムDNAを転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し80℃で2時間の熱処理を行い、固定化した。

一方、サザンブロットに用いるプローブを以下のように調製した。ターゲティングベクターに含まれる FUT8 ゲノム領域よりもさらに 5' 側の配列に特異的に結合するプライマー（配列番号 45 および配列番号 46）を用いて、以下の PCR を行った。W002/31140 の実施例 12 に記載の pFUT8fgE2-2 4.0ng をテンプレートとして含む 20  $\mu$ L の反応液 [DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製)、ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5  $\mu$ mol/L 上記プライマー] を調製し、94°C で 1 分間の加熱の後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、74°C で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で PCR を行った。

PCR 後、該反応液を 1.75% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BIO101 社製) を用いて、約 230bp のプローブ DNA 断片を精製した。得られたプローブ DNA 溶液のうち 5  $\mu$ L を、[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下の様に行った。まず、上記のゲノム DNA 消化物が転写されたナイロン膜をローラーボトルへ封入し、ハイブリダイゼーション液 [5 $\times$ SSPE、50 $\times$ Denhardt's 液、0.5% (w/v) SDS、100  $\mu$ g/mL サケ精子 DNA] 15mL を加えて 65°C で 3 時間のプレハイブリダイゼーション後、<sup>32</sup>P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 50mL の一次洗浄液 [2 $\times$ SSC+0.1% (w/v) SDS] に浸漬し、65°C で 15 分間加温して洗浄した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、ナイロン膜を 50mL の二次洗浄液 [0.2 $\times$ SSC+0.1% (w/v) SDS] に浸漬し、65°C で 15 分間加温して洗浄した。洗浄後、ナイロン膜を X 線フィルムへ -80°C で暴露し現像した。

第 4 図には、親株である CHO/DG44 細胞、本実施例の 2 項に記載の 50-10-104 株、本実施例の 3 項に記載の WK704 株、および WK704 株から本項 (2) に記載の方法により取得した薬剤感受性クローンの 1 つである 4-5-C3 株のゲノム DNA を、本法により解析した結果を示した。CHO/DG44 細胞では、野生型 FUT8 対立遺伝子に由来する約 8.0Kb の DNA 断片のみが検出された。また、50-10-104 株や WK704 株では、相同組換えが起こった対立遺伝子に由来する約 9.5Kb の DNA 断片が認められた。一方、4-5-C3 株では、相同組換えが起こった対立遺伝子からさらにネオマイシン耐性遺伝子 (約 1.6Kb) およびピューロマイシン耐性遺伝子 (約 1.5Kb) が除去

されて生じる約 8.0Kb の DNA 断片のみが検出された。この結果から 4-5-C3 株は、Cre リコンビナーゼにより薬剤耐性遺伝子が除去されたことが確認された。

薬剤耐性遺伝子の除去された FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローン（以下、FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞と表記する）は、4-5-C3 株以外にも複数株取得された。

## 実施例 2

FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞による抗ガングリオシド GM2 ヒト CDR 移植抗体組成物の発現

### 1. FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞での安定発現

実施例 1 の 4 項に記載の FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞および親株である CHO/DG44 細胞に、特開平 10-257893 記載の抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクター pKANTEX796HM2Lm-28No. 1 を導入し、抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

pKANTEX796HM2Lm-28No. 1 を制限酵素 AatII (New England Biolabs 社製) で消化して線状化した後、直線状化された  $10\mu\text{g}$  の pKANTEX1259HV3LV0 を  $1.6 \times 10^6$  個の FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞および親株である CHO/DG44 細胞へエレクトロポレーション法[Cytotechnology, 3, 133 (1990)]により導入後、10mL の IMDM-dFBS (10)-HT (1) [透析 FBS (インビトロジェン社製) を 10%、HT supplement (インビトロジェン社製) を 1 倍濃度で含む IMDM 培地 (インビトロジェン社製)] に懸濁し、 $75\text{cm}^2$  フラスコ (グライナー社製) に播種した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃、24 時間培養後、G418 (ナカライテスク社製) を  $500\mu\text{g/mL}$  の濃度で含む IMDM-dFBS (10) [透析 FBS を 10% で含む IMDM 培地] に培地交換し、1~2 週間培養した。最終的に G418 を  $500\mu\text{g/mL}$  の濃度で含む IMDM-dFBS (10) 培地で増殖可能かつ、抗 GM2 ヒト型 CDR 移植抗体を生産する形質転換株を得た。親株の CHO/DG44 細胞より得られた形質転換株を DG44/GM2 株、FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞より得られた形質転換株を Ms705/GM2 株と名付けた。

### 2. 培養上清中のヒト IgG 抗体濃度の測定 (ELISA 法)

ヤギ抗ヒト IgG (H&L) 抗体 (American Qualex 社製) を Phosphate Buffered Saline (以下、PBS と表記する) (インビトロジェン社製) で希釈して  $1\mu\text{g/mL}$  とし、96 穴の ELISA 用プレート

(グライナー社製) に、50  $\mu$ L/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、BSA を 1% の濃度で含む PBS (以下、1%BSA-PBS と表記する) (和光純薬社製) を 100  $\mu$ L/ウェルに加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、形質転換株の培養上清、または培養上清から精製した抗体の各種希釈溶液を 50  $\mu$ L/ウェルに加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween20 を 0.05% の濃度で含む PBS (以下、Tween-PBS と表記する) (和光純薬社製) で各ウェルを洗浄後、1%BSA-PBS で 2000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG (H&L) 抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として、それぞれ 50  $\mu$ L/ウェルに加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 [2,2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) アンモニウム (和光純薬社製) の 0.55g を 1L の 0.1M クエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素 (和光純薬社製) を 1  $\mu$ L/mL で添加した溶液] を 50  $\mu$ L/ウェルで加えて発色させ、415nm の吸光度 (以下、OD415 と表記する) を測定した。

### 3. 抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物の精製

実施例 2 の 1 項で得られた形質転換細胞株 DG44/GM2 株および Ms705/GM2 株を用いて、それぞれが生産する抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物を以下のようにして精製した。

各々の形質転換株を、G418 を 500  $\mu$ g/mL の濃度で含む IMDM-dFBS (10) に懸濁し、30mL を 182cm<sup>2</sup> フラスコ (グライナー社製) に播種して 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃、数日間培養した。細胞密度がコンフルエントになった時点で培養上清を除去し、25mL の PBS で細胞を洗浄後、EXCELL301 培地 (JRH Biosciences 社製) 30mL を注入した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃、7 日間培養後、細胞懸濁液を回収し、3000rpm、4℃の条件で 5 分間の遠心分離を行って上清を回収した後、0.22  $\mu$ m 孔径 Millex GV フィルター (ミリポア社製) を用いて濾過滅菌した。上述の方法により取得した培養上清より、Mab Select (Amersham Biosciences 社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物を精製した。精製した抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物は、DG44/GM2 株より得られた抗体組成物を DG44/GM2 抗体、Ms705/GM2 株より得られた抗体組成物を Ms705/GM2 抗体と名付けた。

### 実施例 3

FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞が生産する抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物の生物活性

#### 1. 抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物のガングリオシド GM2 に対する結合活性 (ELISA 法)

実施例 2 の 3 項で精製した DG44/GM2 抗体および Ms705/GM2 抗体のガングリオシド GM2 に対する結合活性を、以下のようにして測定した。

57.5ng のガングリオシド GM2 (シグマ社製) を 10ng のフォスファチジルコリン (シグマ社製) と 5ng のコレステロール (シグマ社製) とを含む 2mL のエタノール溶液に溶解した。この溶液 20  $\mu$ L を 96 穴の ELISA 用プレート (グライナー社製) の各ウェルにそれぞれ分注し、風乾後、1%BSA-PBS 溶液を 100  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、実施例 2 の 3 項で調製した DG44/GM2 抗体または Ms705/GM2 抗体の各種希釈溶液を 50  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で各ウェルを洗浄後、1%BSA-PBS 溶液で 2000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG (H&L) 抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として 50  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液を 50  $\mu$ L/ウェルで加えて発色させ、OD415 を測定した。

第 5 図には、DG44/GM2 抗体および Ms705/GM2 抗体のガングリオシド GM2 に対する結合活性を示した。両抗体はガングリオシド GM2 に対して同等の結合活性を有していた。

#### 2. 抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物の *in vitro* 細胞傷害活性 (ADCC 活性)

実施例 2 の 3 項で得られた DG44/GM2 抗体および Ms705/GM2 抗体の *in vitro* 細胞傷害活性を以下のようにして測定した。

##### (1) 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FCS (10) 培地 [10%FCS を含む RPMI1640 培地 (インビトロジェン社製)] で培養したヒト肺小細胞癌株 SBC-3 細胞 (JCRB 0818) を、遠心分離操作及び懸濁により RPMI1640-FCS (5) 培地 [5%FCS を含む RPMI1640 培地 (インビトロジェン社製)] で洗浄した後、RPMI1640-FCS (5) 培地によって、 $2 \times 10^5$  細胞/mL に調製し、標的細胞溶液とした。



## (2) エフェクター細胞溶液の調製

健康人静脈血 50mL を採取し、ヘパリンナトリウム（清水製薬社製）0.5mL を加え穏やかに混ぜた。これを Lymphoprep（AXIS SHIELD 社製）を用いて、添付の使用説明書に従い単核球層を分離した。RPMI1640-FCS(5) 培地で 3 回遠心分離して洗浄後、同培地を用いて  $5 \times 10^6$  細胞/mL の濃度で懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

## (3) ADCC 活性の測定

96 ウェル U 字底プレート（Falcon 社製）の各ウェルに上記（1）で調製した標的細胞溶液の  $50 \mu\text{L}$  ( $1 \times 10^4$  細胞/ウェル) を分注した。次いで（2）で調製したエフェクター細胞溶液を  $50 \mu\text{L}$  ( $2.5 \times 10^5$  細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 25:1 となる) 添加した。更に、各種抗 GM2 ヒト型 CDR 移植抗体を各最終濃度 0.1~1000ng/mL となるように加えて全量を  $150 \mu\text{L}$  とし、 $37^\circ\text{C}$  で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 活性を、CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay（Promega 社製）を用いて、添付の説明書にしたがって吸光度データを取得することで測定した。標的細胞自然遊離の吸光度データは、エフェクター細胞溶液および抗体溶液の代わりに培地のみを用いて、また、エフェクター細胞自然遊離の吸光度データは、標的細胞溶液および抗体溶液の代わりに培地のみを用いて、上記と同様の操作を行うことで取得した。標的細胞全遊離の吸光度データは、抗体溶液、エフェクター細胞溶液の代わりに培地を用い、反応終了 45 分前に  $15 \mu\text{L}$  の 9% Triton X-100 溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の LDH 活性を測定することにより求めた。ADCC 活性は次式により求めた。

$$\text{細胞傷害活性} = \{ [\text{検体の吸光度}] - [\text{エフェクター細胞自然遊離の吸光度}] - [\text{標的細胞自然遊離の吸光度}] \} / \{ [\text{標的細胞全遊離の吸光度}] - [\text{標的細胞自然遊離の吸光度}] \}$$

第 6 図には、DG44/GM2 抗体および Ms705/ GM2 抗体のヒト肺小細胞癌株 SBC-3 細胞に対する細胞傷害活性を示した。Ms705/ GM2 抗体はいずれの抗体濃度においても DG44/ GM2 抗体よりも高い ADCC 活性を示し、最高細胞傷害活性値も高い値を示した。

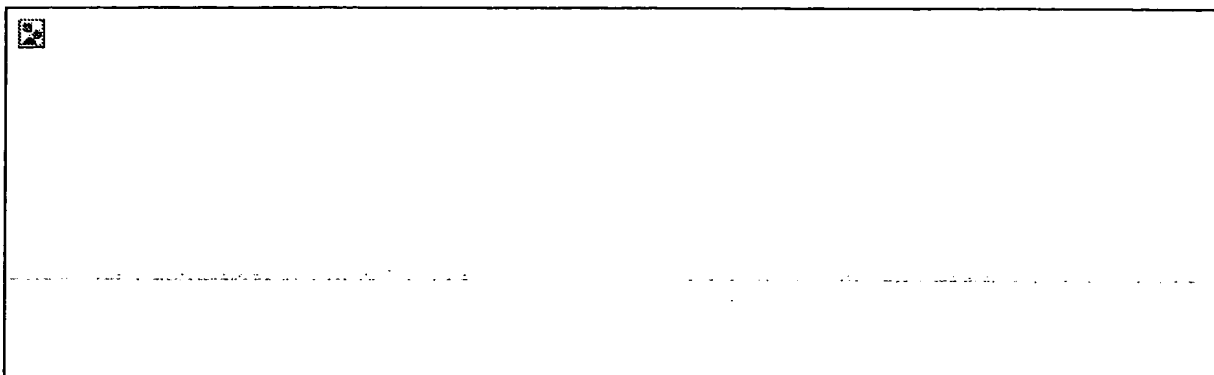
#### 実施例 4

#### FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞が生産する抗 GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物の単糖組成分析

実施例 1 の 3 項で精製した DG44/GM2 抗体および Ms705/GM2 抗体の中性糖・アミノ糖組成分析を、以下の様にして行った。

抗体を遠心濃縮機で減圧下乾固した後、2.0～4.0mM のトリフルオロ酢酸溶液を加えて 100℃、2～4 時間酸加水分解を行い、タンパク質から中性糖・アミノ糖を遊離した。トリフルオロ酢酸溶液を遠心濃縮機で除去し、脱イオン水に再溶解して Dionex 社製糖分析装置 (DX-500) を用いて分析を行った。CarboPac PA-1 カラム、CarboPac PA-1 ガードカラム (Dionex 社製) を用い、溶離液として 10～20mM 水酸化ナトリウム-脱イオン水溶解液、洗浄液として 500mM 水酸化ナトリウム-脱イオン水溶解液を使用して、第 1 表に示した溶出プログラムで分析した。

第 1 表



得られた溶出プロファイルの中性糖・アミノ糖成分のピーク面積から、N-アセチルグルコサミン比を 4 とした場合の各成分（フコース、ガラクトース、マンノース）の組成比を算出した。

第 2 表に各抗体の単糖組成比により計算される、全 N-グリコシド結合複合型糖鎖に占める、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を示した。DG44/GM2 抗体ではフコースが結合していない糖鎖の割合が 4% であった。一方、Ms705/GM2 抗体ではフコースのピークは検出限界以下であったことから、フコースが結合していない糖鎖の割合はほぼ 100% と見積もられた。

以上の結果より、Ms705/GM2 抗体の N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンには、フコースが結合していないことが示された。

第 2 表

抗 GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物のフコースが結合していない糖鎖の割合

抗体名	フコースを含まない糖鎖率 (%)
DG44/GM2 抗体	4%
Ms705/GM2 抗体	~100%

#### 実施例 5

フコースが結合していない糖鎖を有する抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物の生物活性の解析

実施例 3 の 2 項において、Ms705/GM2 抗体が DG44/GM2 抗体よりも高い ADCC 活性を有することを示した (第 6 図)。本実施例では、本発明のフコースが結合していない糖鎖を有する抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物の優位性をさらに明らかにするため、フコースが結合した糖鎖を有する抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体が混合された抗体組成物との生物活性の比較を以下のようにして行った。

フコースが結合していない糖鎖を有する抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体からなる Ms705/GM2 抗体に、フコースが結合した糖鎖を有する抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体を混合させた場合の細胞傷害活性の変化を調べた。抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体の ADCC 活性は、以下のようにして測定した。

##### 1. 標的細胞溶液の調製

実施例 3 の 2 項の (1) に記載の方法に従って行った。

##### 2. エフェクター細胞溶液の調製

実施例 3 の 2 項の (2) に記載の方法に従って単核球層を分離し、RPMI1640-FCS (5) 培地を用いて  $4 \times 10^6$  細胞/mL の濃度で懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

##### 3. ADCC 活性の測定

96 ウェルU字底プレート (Falcon 社製) の各ウェルに、上記 (1) で調製した標的細胞溶液を  $50\mu\text{L}$  ( $1\times 10^4$  細胞/ウェル) 分注した。次いで (2) で調製したエフェクター細胞溶液を  $50\mu\text{L}$  ( $2\times 10^5$  細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 20:1 となる) 添加した。更に、Ms705/GM2 抗体および DG44/GM2 抗体をそれぞれ単独で、または両者を混合して加えて全量を  $150\mu\text{L}$  とし、 $37^\circ\text{C}$  で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 活性を LDH-Cytotoxic Test Wako (和光純薬社製) を用いて添付の説明書に従い測定した。ADCC 活性は実施例 3 の 2 項に記載の方法に従って算出した。

一定量の Ms705/GM2 抗体に DG44/GM2 抗体を添加することで、一定量のフコース非結合型抗体を含み、かつフコース非結合型抗体の割合を変化させた抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物、即ち、一定量の Ms705/GM2 抗体に、Ms705/GM2 抗体の 0~100 倍量の DG44/GM2 抗体を添加した抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物を調製し、該抗体組成物の ADCC 活性を測定した。

Ms705/GM2 抗体にさらに Ms705/GM2 抗体を添加すると、総抗体量の増加にともなって ADCC 活性の上昇が観察された。一方、Ms705/GM2 抗体にさらに DG44/GM2 抗体を添加すると、総抗体濃度が増加するにも関わらず調製した抗体組成物の ADCC 活性は逆に低下した。このことは、フコースが結合した糖鎖を有する抗体分子が、フコースが結合していない糖鎖を有する抗体分子の活性を阻害することを示している。また、フコースが結合した糖鎖を有する抗体分子とフコースが結合していない糖鎖を有する抗体分子が混合された抗体組成物においても、フコースが結合していない糖鎖を有する抗体分子の割合が 20%以上の抗体組成物では、該割合が 20%未満の抗体組成物に比べ顕著に高い ADCC 活性を示した。さらに、Ms705/GM2 抗体サンプルと、同じ量の Ms705/GM2 抗体に 9 倍量の DG44/GM2 抗体を加えた抗体サンプルの ADCC 活性を測定した。Ms705/GM2 抗体の ADCC 活性は、DG44/GM2 抗体を加えることで大幅に低下した。Ms705/GM2 抗体と DG44/GM2 抗体の存在比が 1 対 9 のまま抗体組成物の抗体濃度を 100 倍に上昇させても、その 1/100 の抗体濃度の Ms705/GM2 抗体サンプルの ADCC 活性には及ばなかった。このことは、本発明のフコースが結合していない糖鎖を有する抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体分子のみからなる抗体組成物の医薬としての優位性を示している。

したがって、本発明のフコースが結合していない糖鎖を有する抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体組成物によって、これまでの抗ガングリオシド GM2 ヒト型 CDR 移植抗体分子を含む抗体組成物では治療できなかった患者を治療することができる。

#### 配列表フリーテキスト

配列番号 22-人工配列の説明：抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 23-人工配列の説明：抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 24-人工配列の説明：抗体軽鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 25-人工配列の説明：抗体軽鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 26-人工配列の説明：抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 27-人工配列の説明：抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 28-人工配列の説明：抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 29-人工配列の説明：抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 30-人工配列の説明：抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 31-人工配列の説明：抗体軽鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 32-人工配列の説明：抗体軽鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 33-人工配列の説明：抗体軽鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 34-人工配列の説明：抗体軽鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 35-人工配列の説明：抗体軽鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 36-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 37-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 38-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 39-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 40-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 41-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 42-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 43-人工配列の説明：合成 DNA

## 請求の範囲

1. ガングリオシド GM2 に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体組成物。
2. N-グリコシド結合複合型糖鎖が、該糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖である、請求の範囲 1 に記載の抗体組成物。
3. ガングリオシド GM2 発現細胞に特異的に結合する請求の範囲 1 または 2 に記載の抗体組成物。
4. ガングリオシド GM2 発現細胞に対し細胞傷害活性を示す請求の範囲 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。
5. ガングリオシド GM2 発現細胞に対し、非ヒト動物由来ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体よりも高い細胞傷害活性を示す請求の範囲 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。
6. 細胞傷害活性が抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性である請求の範囲 4 または 5 に記載の抗体組成物。
7. 細胞傷害活性が補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性である請求の範囲 4 または 5 に記載の抗体組成物。
8. それぞれ配列番号 14、15 および 16 で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子重鎖(H鎖)可変領域 (V 領域) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3 を含む、請求の範囲 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。
9. それぞれ配列番号 17、18 および 19 で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子軽鎖(L鎖)可変領域 (V 領域) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3 を含む、請求の範囲 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。
10. それぞれ配列番号 14、15 および 16 で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子重鎖(H鎖)可変領域 (V 領域) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号 17、18 および 19 で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3 を含む、請求の範囲 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

- 1 1. 遺伝子組換え抗体がヒト型キメラ抗体またはヒト型 CDR 移植抗体である請求の範囲 1 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。
- 1 2. ヒト型キメラ抗体がガングリオシド GM2 に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) を含む、請求の範囲 1 1 に記載の抗体組成物。
- 1 3. 抗体分子の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 20 で示されるアミノ酸配列を含む請求の範囲 1 2 に記載の抗体組成物。
- 1 4. 抗体分子の軽鎖 (L 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 21 で示されるアミノ酸配列を含む請求の範囲 1 2 に記載の抗体組成物。
- 1 5. 抗体分子の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 20 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖 (L 鎖) V 領域が、配列番号 21 で示されるアミノ酸配列を含む請求の範囲 1 2 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載のヒト型キメラ抗体組成物。
- 1 6. ヒト型 CDR 移植抗体がガングリオシド GM2 に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) を含む、請求の範囲 1 1 に記載の抗体組成物。
- 1 7. ガングリオシド GM2 に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) とヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のフレームワーク領域 (FR) を含む、請求の範囲 1 6 に記載の抗体組成物。
- 1 8. ガングリオシド GM2 に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) とヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のフレームワーク領域 (FR)、ならびにヒト抗体の H 鎖定常領域 (C 領域) および L 鎖 C 領域を含む、請求の範囲 1 6 または 1 7 に記載の抗体組成物。
- 1 9. 抗体分子の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 22 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 22 で示されるアミノ酸配列のうち、38 番目の Arg、40 番目の Ala、43 番目の Gln および 44 番目の Gly のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求の範囲 1 6 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。
- 2 0. 抗体分子の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 23 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 23 で示されるアミノ酸配列のうち、67 番目の Arg、72 番目の Ala、84 番目

の Ser および 98 番目の Arg のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求の範囲 1 6 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

2 1. 抗体分子の軽鎖(L 鎖)可変領域(V 領域)が、配列番号 24 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列のうち、15 番目の Val、35 番目の Tyr、46 番目の Leu、59 番目の Ser、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、72 番目の Phe および 76 番目の Ser から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求の範囲 1 6 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

2 2. 抗体分子の軽鎖(L 鎖)可変領域(V 領域)が、配列番号 25 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 25 で示されるアミノ酸配列のうち、4 番目の Met、11 番目の Leu、15 番目の Val、35 番目の Tyr、42 番目の Ala、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、77 番目の Leu および 103 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求の範囲 1 6 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

2 3. 抗体分子の重鎖(H 鎖)可変領域(V 領域)が、配列番号 22 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 22 で示されるアミノ酸配列のうち、38 番目の Arg、40 番目の Ala、43 番目の Gln および 44 番目の Gly から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖 (L 鎖) V 領域が、配列番号 24 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列のうち、15 番目の Val、35 番目の Tyr、46 番目の Leu、59 番目の Ser、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、72 番目の Phe および 76 番目の Ser から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求の範囲 1 6 ～ 1 9 または 2 1 に記載の抗体組成物。

2 4. 抗体分子の重鎖(H 鎖)可変領域(V 領域)が、配列番号 23 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 23 で示されるアミノ酸配列のうち、67 番目の Arg、72 番目の Ala、84 番目の Ser および 98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖 (L 鎖) V 領域が、配列番号 24 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 24 で示されるアミノ酸配列のうち、15 番目の Val、35 番目の Tyr、46 番目の Leu、59 番目の Ser、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、



72 番目の Phe および 76 番目の Ser から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求の範囲 16～18、20 または 21 に記載の抗体組成物。

25. 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 23 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 23 で示されるアミノ酸配列のうち、67 番目の Arg、72 番目の Ala、84 番目の Ser および 98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が、配列番号 25 で示されるアミノ酸配列、または配列番号 25 で示されるアミノ酸配列のうち、4 番目の Met、11 番目の Leu、15 番目の Val、35 番目の Tyr、42 番目の Ala、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、77 番目の Leu および 103 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求の範囲 16～18、20 または 22 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

26. 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、それぞれ配列番号 22、26、27、28、29 および 30 で示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む、請求の範囲 16～20、23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

27. 抗体分子の軽鎖(L鎖)可変領域(V領域)が、それぞれ配列番号 31、32、33、34 および 35 で示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む請求の範囲 16～18、21～25 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

28. 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 22、26、27、28、29、30 で示されるから選ばれるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含み、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が、配列番号 31、32、33、34 および 35 で示されるアミノ酸配列から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む請求の範囲 16～27 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

29. 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 26 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が配列番号 31 または 32 で示されるアミノ酸配列を含む請求の範囲 16～19、21、23、26～28 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

30. 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号 22 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が配列番号 32 または 35 で示されるアミノ酸配列を

含む請求の範囲 16～19、21～23、26～28 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

31. ガングリオシド GM2 に特異的に結合する抗体分子をコードする DNA を宿主細胞に導入して得られる、請求の範囲 1～30 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物を生産する形質転換体。

32. 宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素、または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素を失活するようにゲノムが改変された細胞である、請求の範囲 31 に記載の形質転換体。

33. 宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素、または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム上の対立遺伝子のすべてがノックアウトされた細胞である、請求の範囲 31 に記載の形質転換体。

34. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ (GMD) または GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ (Fx) から選ばれる酵素である、請求の範囲 32 または 33 に記載の形質転換体。

35. GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の (a) および (b) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 34 に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

36. GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の (a)～(c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 34 に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質。

37. GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の (a) および (b) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 34 に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 3 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 3 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

38. GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の (a) ~ (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 34 に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質。

39. N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素が  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼである請求の範囲 32 または 33 に記載の形質転換体。

40.  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a) ~ (d) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 39 に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 5 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 6 で表される塩基配列からなる DNA ;

(c) 配列番号 5 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA ;

(d) 配列番号 6 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

41.  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a) ~ (f) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 39 に記載の形質転換体。

- (a) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (b) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (c) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (d) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (e) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (f) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

4 2. 形質転換体が FERM BP-8470 である請求の範囲 4 1 に記載の形質転換体。

4 3. 宿主細胞が、下記の (a)～(i) からなる群から選ばれる細胞である請求の範囲 3 1 ～ 4 2 のいずれか 1 項に記載の形質転換体。

- (a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞；
- (b) ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL. P2. G11. 16Ag. 20 細胞；
- (c) マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞；
- (d) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞；
- (e) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；
- (f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；
- (g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
- (h) 胚性幹細胞；
- (i) 受精卵細胞。

4 4. 請求の範囲 3 1 ～ 4 3 のいずれか 1 項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該抗体組成物を採取し、精製する、請求の範囲 1 ～ 3 0 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物の製造方法。

4 5. 請求の範囲 4 4 に記載の製造方法により得られる、請求の範囲 1 ～ 3 2 のいずれか

1 項に記載の抗体組成物。

4 6. 請求の範囲 1 ～ 3 0 および 4 5 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物を有効成分として含有する医薬。

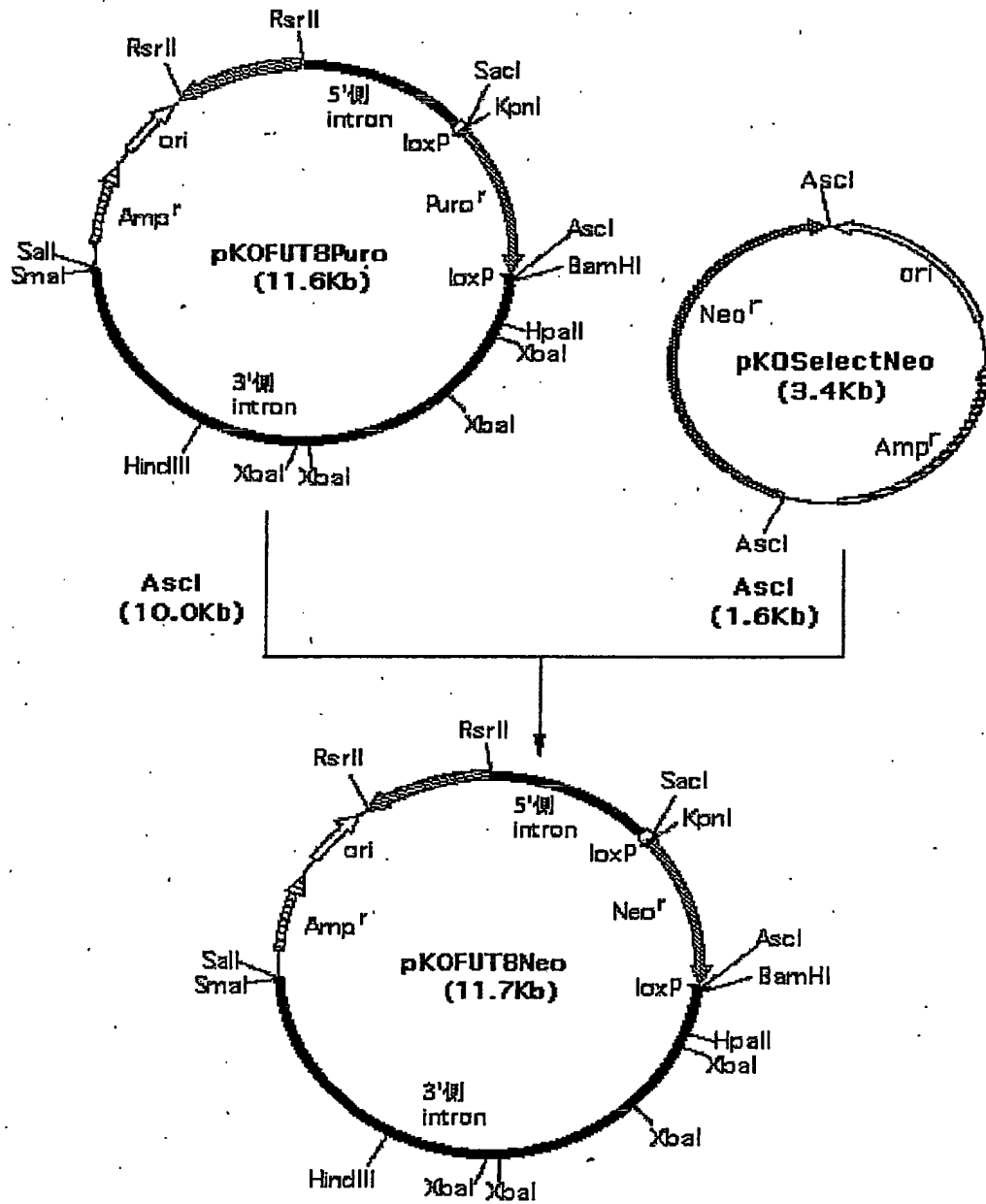
4 7. 請求の範囲 1 ～ 3 0 および 4 5 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物を有効成分として含有するガングリオシド GM2 関連疾患の治療薬。

4 8. ガングリオシド GM2 関連疾患が癌である請求の範囲 4 7 に記載の治療薬。

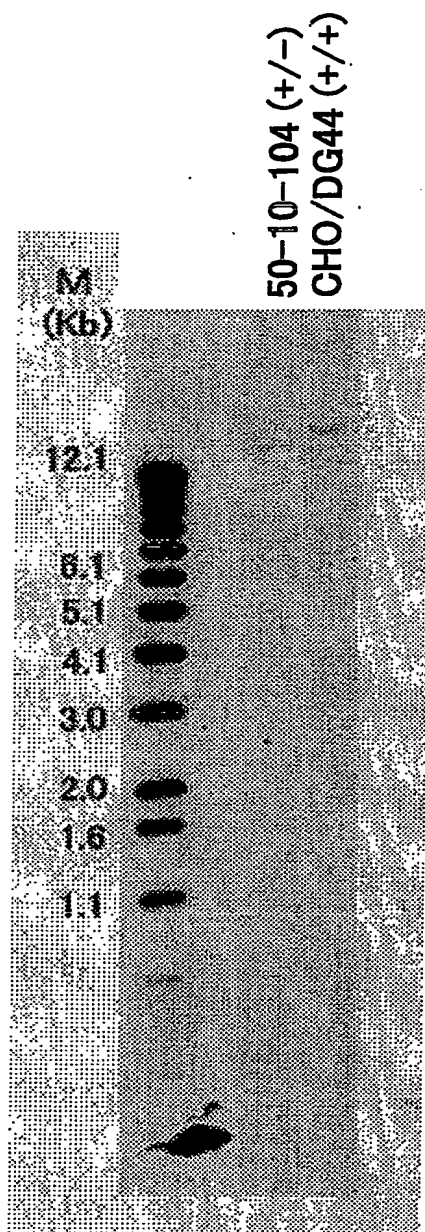
## 要約書

エフェクター機能が増強された医薬品として有用な抗ガングリオシド GM2 抗体組成物が求められている。ガングリオシド GM2 に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体組成物、該抗体組成物を生産する形質転換体、該抗体組成物の製造方法および該抗体組成物を含有する医薬を提供する。

# 第 1 図

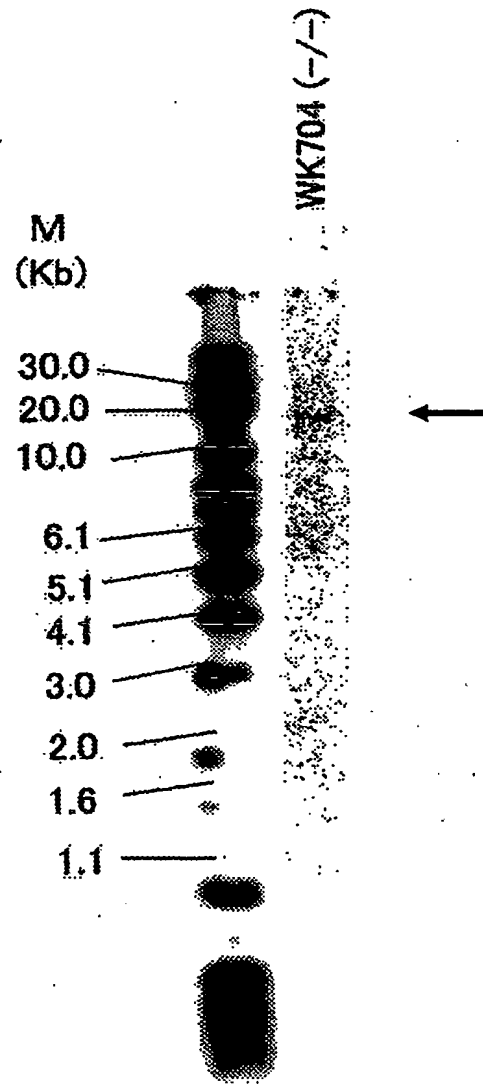


## 第 2 図

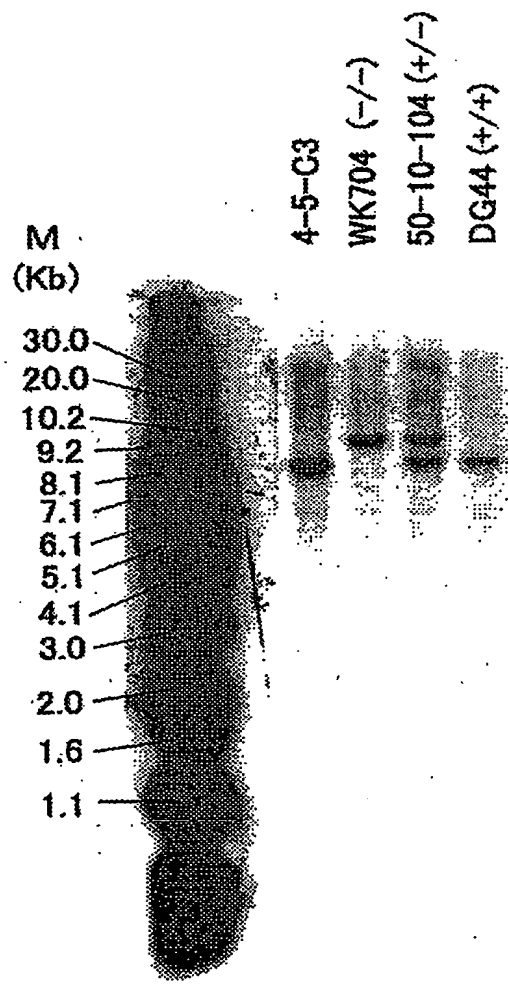




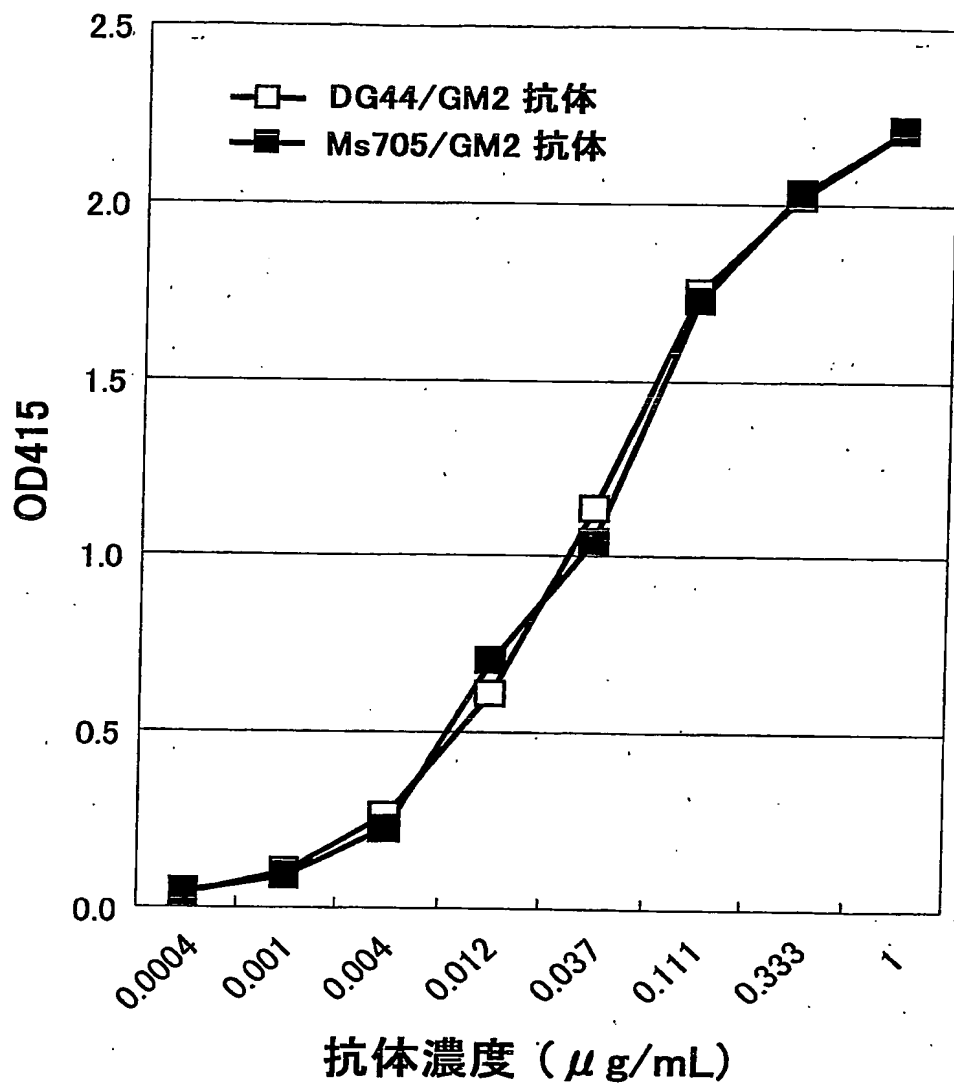
### 第 3 図



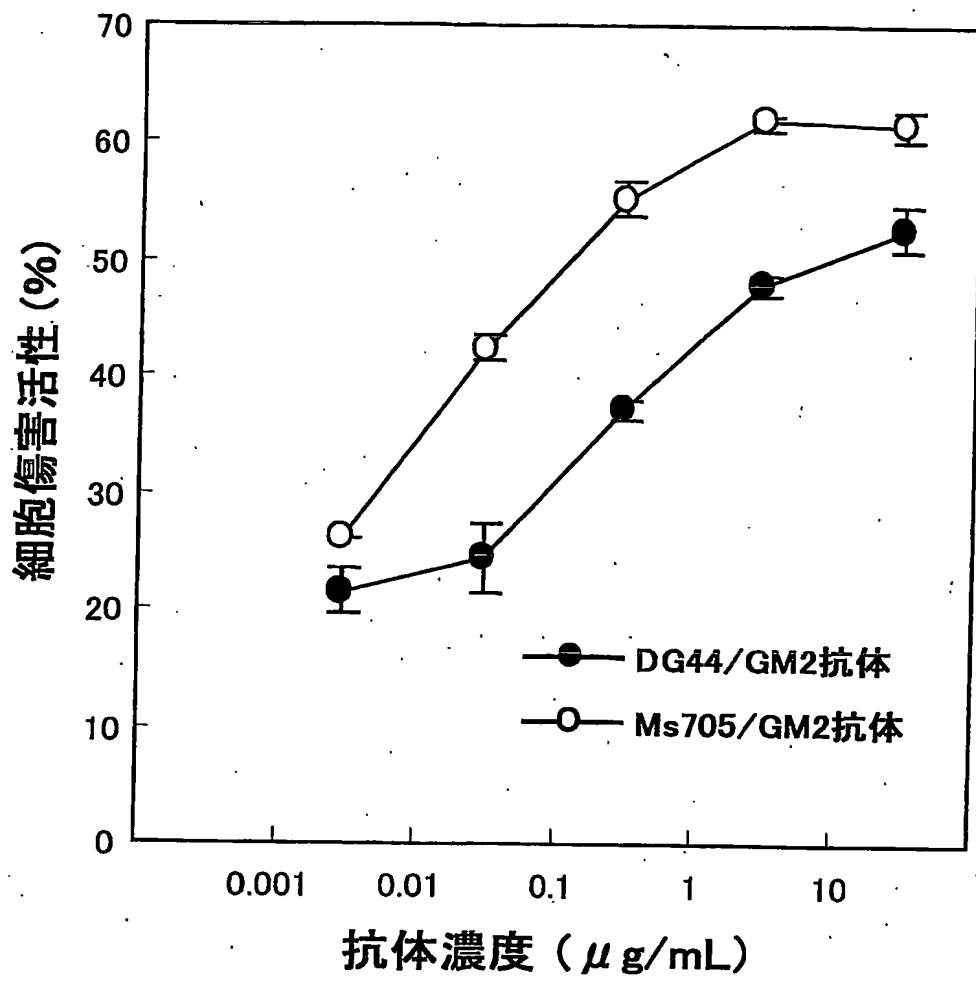
# 第 4 図



第 5 図



第 6 図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**